

INAUGURAL – DISSERTATION  
ZUR  
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE  
DER  
NATURWISSENSCHAFTLICH-MATHEMATISCHEN GESAMTFAKULTÄT  
DER  
RUPRECHT – KARLS – UNIVERSITÄT  
HEIDELBERG

VORGELGT VON  
DIPLOM-CHEMIKER CHRISTIAN CHRISTOPH THEOPHIL WÖRTH  
AUS FRANKFURT/MAIN

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 03. AUGUST 2000

ENTWICKLUNG EINES NACHWEIS-VERFAHRENS  
FÜR DNA-ADDUKTE  
BASIEREND AUF FLUORESZENZDERIVATISIERUNG  
UND KAPILLARELEKTROPHORETISCHER TRENNUNG

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Wießler  
Prof. Dr. Horst Ludwig

AUS DER ABTEILUNG  
MOLEKULARE TOXIKOLOGIE  
LEITER: PROF. DR. RER. NAT. MANFRED WIEßLER  
AM DEUTSCHEN KREBSFORSCHUNGSZENTRUM HEIDELBERG

Meinen lieben Eltern und Diane

## DANKSAGUNG

Mein Dank gilt ...

- ganz besonders Herrn Prof. Dr. M. Wießler für das entgegengebrachte Vertrauen, das interessante Thema, die guten Arbeitsbedingungen und seine stete Diskussionsbereitschaft.
- Herrn Prof. Dr. H. Ludwig für die freundliche Übernahme des zweiten Referates.
- in besonderem Maße Dr. O. Schmitz als Kollege, Freund und kritischer Korrektor. Die ergiebige Zusammenarbeit war Grundstein für den Erfolg dieser Arbeit.
- Dr. H. Schmeiser für die tiefen Einblicke in die Bedeutung, Kniffe und Chancen der DNA-Addukt-Analytik – und des Fußballs.
- Dr. C. Bieler für seine aufmunternden Worte in Zeiten des Mißerfolgs, für seine Freundschaft und sein geduldiges Einführen in die Welt des Postlabelings.
- Dr. W. E. Hull für die Aufnahme der hochaufgelösten Spektren und die wertvolle Interpretation.
- G. Erben für die Aufnahme der Massenspektren – ohne seine freundliche Unterstützung wäre die Fluoreszenzmarkierung nicht zustande gekommen.
- Dr. W. Weinig für die Synthese der modifizierten Oligonukleotide.
- Dr. M. Sauer für seine Hilfe bei der Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeuten.
- H. Braun und J. Reinhard, die als Laborkollegen immer angenehm, sehr oft witzig, selten schlecht gelaunt und nie störend waren.
- E. Müller, P. Lorenz und I. Schindler für ihre Freundlichkeit, ihren Witz, eine stets griffbereite Tageszeitung, frischen Kaffee und unzählige Dinge mehr.
- Martina, Hans-Christian, Volker, Bernd, Erwin, Dirk, Rainer, Evi, Charly und allen anderen aktuellen oder ehemaligen Mitgliedern der Abteilung für ihre Freundschaft, ihre wertvollen Tips und ständige Hilfsbereitschaft.
- der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, Osnabrück, für die finanzielle Unterstützung (Kennziffer 13889) dieser Arbeit.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm ( $10^{-6}$ g)
µl	Mikroliter ( $10^{-6}$ l)
µm	Mikrometer ( $10^{-6}$ m)
µM	mikromolar ( $10^{-6}$ mol/l)
2-OH-dAde	2-Hydroxy-2'-desoxyadenosin
3'-dA	2'-Desoxyadenosin-3'-monophosphat
3'-dC	2'-Desoxycytidin-3'-monophosphat
3'-dG	2'-Desoxyguanosin-3'-monophosphat
3'-dT	2'-Desoxythymidin-3'-monophosphat
3-NBA	3-Nitro-7H-benz[d,e]anthracen-7-on (3-Nitrobenzanthron)
5'-dA	2'-Desoxyadenosin-5'-monophosphat
8-oxo-dG	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin-3'-monophosphat
8-oxo-dGua	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin
AA I	Aristolochiasäure I
AA II	Aristolochiasäure II
AFB <sub>1</sub> -FAPyr	2,3-Dihydro-2-(N <sup>5</sup> -formyl-2,5,6-triamino-4-oxypyrimidin-N <sup>5</sup> -yl)-3-hydroxyafatoxin B <sub>1</sub>
AFB <sub>1</sub> -N7-Gua	8,9-Dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxyafatoxin B <sub>1</sub>
AT	N-Acetyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
attomol	Attomol ( $10^{-18}$ mol)
AZT	3-Azido-2,3-didesoxythymidin
B[a]P	Benzo[a]pyren
BODIPY-EDA	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylendiamin-hydrochlorid
C	Cytosin
CE	Kapillarelektrophorese
CGE	Kapillargelelektrophorese
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxypropansulfonat
Cisplatin	cis-Diamindichlorplatin(II)
cm	Zentimeter ( $10^{-2}$ m)
CTAB	Hexadecyl-trimethylammoniumchlorid
CT-DNA	Kalbsthymus-DNA
CZE	Kapillarzonenlektrophorese
dA-AA I,II	7-(2'-Desoxyadenosin-N <sup>6</sup> -yl)-aristolactam I,II
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DDT	1,1-(p,p'-Dichlordiphenyl)-2-trichlorethan
dG-AA I,II	7-(2'-Desoxyguanosin-N <sup>2</sup> -yl)-aristolactam I,II
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DmTr	Dimethoxytrityl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	DNaseI aus Rinderbauchspeicheldrüse
dR	Desoxyribose
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EOF	elektroosmotischer Fluß
ESI	elektrospray-ionization
ESI-DAU (X)	Tochterionenspektrum der Verbindung der Masse X
etheno-dA	1,N <sup>6</sup> -etheno-2'-desoxyadenosin-3'-monophosphat
FLNS	fluorescence-line-narrowing spectroscopy
GC	Gaschromatographie
GLY	Glycinethylester
GSH	Glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffsuperoxid
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HSA	humanes Serumalbumin
L <sub>eff</sub>	effektive Länge der Kapillare bis zum Detektionsfenster

$L_{\text{ges}}$	Gesamtlänge der Kapillare
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
M	molar (1mol/l)
MALDI-TOF	matrix-assisted laser-desorption ionization – time-of-flight
mC	5-Methylcytosin
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethylimidazol[4,5-f]chinolin
MEKC	micellare elektrokinetische Chromatographie
MES	2-( <i>N</i> -morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm ( $10^{-3}$ g)
mM	millimolar ( $10^{-3}$ mol/l)
MN	Mikrokokkennuklease
MS	Massenspektrometrie
Mtase	(Cytosin-5)-methyltransferase
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
nl	Nanoliter ( $10^{-9}$ l)
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ m)
nM	nanomolar ( $10^{-9}$ mol/l)
nmol	Nanomol ( $10^{-9}$ mol)
NMR	nuclear magnetic resonance
NP1	Nuklease P1
PAH	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia hydrogenii
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
$pK_s$	Logarithmus der Dissoziationskonstante der protonierten Form
pM	picomolar ( $10^{-12}$ mol/l)
RIA	Radioimmunoassay
RP-HPLC	reversed-phase high performance liquid chromatography
S9-Mix	Rattenleberhomogenat
SDS	Natriumdodecylsulfat,
SFS	synchronous fluorescence spectrophotometry
SPD	Milzphosphodiesterase
ST	Sulfotransferase
SVPDE	Schlangengift-Phosphodiesterase
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
USERIA	ultrasensitive enzymatic radioimmunoassay
UV-	ultraviolett-
zeptomol	Zeptomol ( $10^{-21}$ mol)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b>	<b>3</b>
2.1	Theoretischer Hintergrund – DNA-Addukte	3
2.1.1	Chemische Kanzerogenese	3
2.1.2	Metabolische Aktivierung chemischer Kanzerogene	6
2.1.3	DNA-Addukte	7
2.1.3.1	Exogene Kanzerogene	8
2.1.3.2	Endogene DNA-Addukte	13
2.1.3.3	DNA-Methylierung	15
2.1.4	Nachweisverfahren für DNA-Addukte	16
2.2	Theoretischer Hintergrund – Kapillarelektrophorese	20
2.2.1	Historische Entwicklung	20
2.2.2	Apparativer Aufbau	22
2.2.3	Grundlagen	23
2.2.3.1	Elektrophoretische Mobilität	23
2.2.3.2	Elektroosmotischer Fluß	24
2.2.3.3	Joulesche Wärme	28
2.2.4	Detektoren	29
2.2.5	Probenaufgabe	30
2.2.6	Puffersysteme	31
2.2.6.1	pH-Wert	31
2.2.6.2	Pufferadditive	32
2.2.7	Kapillarelektrophoretische Methoden	34
2.2.7.1	Kapillarzonenelektrophorese	34
2.2.7.2	Elektrokinetische Chromatographie	34
2.2.7.3	Kapillargelelektrophorese	37
2.3	Theoretischer Hintergrund – Fluoreszenzmarkierung	37
2.3.1	Charakteristika moderner Fluoreszenzmarker	38
2.3.1.1	Fluorophor	38
2.3.1.2	Ankergruppe	39
2.3.2	Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden	42
<b>3</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden	47
4.1.1	Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden mittels Phosphoramidit-Methode	49
4.1.1.1	Darstellung fluoreszenzmarkierter Referenzsubstanzen	49
4.1.1.2	Fluoreszenzderivatisierung freier Nukleosid-3'-phosphate	54
4.1.1.3	Diskussion	58
4.1.2	Umsetzungen freier 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate mit einfachen Aminen	61
4.1.2.1	Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphorimidazoliden	63
4.1.2.2	Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-3'-ethylendiamin-phosphoramidaten	65
4.1.2.3	Diskussion	67
4.1.3	Entwicklung einer Fluoreszenzderivatisierung von Mononukleotiden mittels Phosphoramidat-Methode	68
4.1.3.1	Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-glycinylester-phosphoramidaten	71
4.1.3.2	Darstellung und Charakterisierung von 2'-Desoxynukleosid-BODIPY-phosphoramidaten	80
4.1.3.3	Alternative Strategien zur Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden	86
4.1.3.4	Diskussion	90
4.2	Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Applikation zur Trennung fluoreszenzmarkierter Mononukleotide	91
4.2.1	Optimierung der Trennparameter	92
4.2.2	Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften BODIPY-markierter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate	98



4.2.3	Untersuchungen zur Sensitivität	101
4.2.3.1	Bestimmung der Nachweisgrenze BODIPY-markierter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate bei kapillarelektrophoretischen Trennungen	102
4.2.3.2	Diskussion des Detektionslimits fluoreszenzmarkierter Nukleotide	104
4.3	Fluoreszenzmarkierung enzymatischer DNA-Hydrolysate	105
4.3.1	Anpassung der DNA-Hydrolyse	106
4.3.2	Kapillarelektrophoretische Untersuchung fluoreszenzmarkierter Nukleotide aus enzymatischer DNA-Hydrolyse	110
4.3.3	Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit	114
4.3.4	Diskussion	115
4.4	Analyse modifizierter Nukleotide aus synthetischen Oligonukleotiden und genomischer DNA	117
4.4.1	Analyse definiert modifizierter Oligonukleotide	117
4.4.1.1	Untersuchung 5-Methyl-dC-modifizierter Oligonukleotide	118
4.4.1.2	Untersuchung etheno-dA-modifizierter Oligonukleotide	119
4.4.1.3	Untersuchung 8-oxo-dG-modifizierter Oligonukleotide	121
4.4.2	Analyse unmodifizierter genomischer DNA	124
4.4.3	Untersuchungen zur quantitativen Auswertung	128
4.4.4	Analyse Aristolochiasäure-modifizierter genomischer DNA	131
4.4.5	Diskussion	136
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>139</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>141</b>
6.1	Geräte und Materialien	141
6.2	Synthesevorschriften	143
6.3	<sup>32</sup> P-postlabeling-Analysen	162
6.4	Fluoreszenzmarkierung enzymatischer DNA-Hydrolysate	163
6.5	Kapillarelektrophoretische Trennung fluoreszenzmarkierter Nukleotide	164
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>165</b>

# 1 Einleitung

In modernen Industrienationen ist Krebs nach Krankheiten des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache. So sterben pro Jahr in Deutschland rund 210000 Personen – dies ist rund ein Viertel aller Todesfälle - an bösartigen Neubildungen [1], während die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen 340000 beträgt. Diese hohe Zahl der Todesfälle belegt, daß die Situation bei der Krebstherapie trotz aller Anstrengungen nach wie vor unbefriedigend ist. Hauptverantwortlich für die Krebsentstehung ist die Exposition gegenüber Umwelteinflüssen, die allgemein in drei Kategorien eingeteilt werden können:

- physikalische Einflüsse wie UV- oder ionisierende Strahlung
- biologische Einflüsse durch bestimmte Bakterien und Viren
- chemische Substanzen

Es wird geschätzt, daß 80 bis 90% aller Krebsfälle auf letztendlich vermeidbare Expositionsarten zurückgeführt werden kann, während der Anteil, der auf genetische Prädisposition beruht, nicht größer als 5 bis 10% zu betragen scheint [1,2]. Als Hauptrisikofaktoren gelten Tabakkonsum (25 bis 30%), Ernährungsgewohnheiten (20 bis 42%), Alkoholkonsum (3%) und berufliche Expositionen (4 bis 8%) [1]. Somit stehen die Möglichkeiten der Krebsprävention vermehrt im Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Schätzungsweise könnten in Deutschland jährlich 36000 bis 46000 krebsbedingte Todesfälle (17 bis 22 %) allein durch die Aufgabe des Rauchens vermieden werden [1].

Nach heutigem Wissensstand ist die Entstehung von Krebserkrankungen ein mehrstufiger Prozess, bei dem die Schädigung des Erbguts eine zentrale Stellung einnimmt [1-3]. Eine besondere Bedeutung kommt chemischen Substanzen als genotoxische Agentien zu. So werden über 500 Chemikalien (20 % aller chronisch-toxikologisch getesteten Substanzen) im Tierexperiment als krebsauslösend eingestuft [3]. 90% aller beim Menschen als krebsauslösend eingestuften Substanzen bilden dabei spontan oder durch metabolische Aktivierung kovalente Modifikationen der DNA (desoxyribonucleic acid) [4], sogenannte DNA-Addukte. Diese strukturellen Veränderungen der Erbsubstanz stellen oftmals den ersten Schritt im Mehrstufenprozeß der chemischen Kanzerogenese dar. Das Wissen, ob eine Chemikalie DNA-Addukte bildet und in welchem Maß, kann einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung von Krebsursachen und mechanistischen Betrachtungen der Krebsentstehung leisten. DNA-Addukte gelten als interne individuelle Dosimeter für die Belastung eines Organismus mit genotoxischen Substanzen und beschreiben die letztendlich biologisch effektive Dosis einer DNA-schädigenden Chemikalie [5]. Somit eignen sie sich als Biomarker

für die Expositionskontrolle, was sie in den Mittelpunkt molekularepidemiologischer Untersuchungen rückt, die zum Beispiel eine Abschätzung des Krebsrisikos in Abhängigkeit der Lebensgewohnheiten zum Ziel hat [1,5] oder im Sinne eines Frühwarnsystems gefährdete Menschen finden und Gegenmaßnahmen einleiten soll.

DNA-Addukte treten *in vivo* nur in äußerst geringen Konzentrationen auf, da nur ein Bruchteil der Nukleotide innerhalb der DNA modifiziert werden und Reparaturmechanismen entgehen. Typischerweise findet man 10 bis 1000 Addukte in einer Zelle. Für eine diploide Zelle mit ca.  $6 \cdot 10^9$  Nukleotiden ergibt sich somit ein Adduktlevel von 1 Addukt auf  $10^6$  bis  $10^8$  unmodifizierten Nukleotiden [6]. In Verbindung mit dem Umstand, daß biologisches Material zur Gewinnung der DNA in der Regel nur in sehr geringem Maße zur Verfügung steht, stellt die Untersuchung dieser prämutagenen Läsionen höchste Anforderungen an die Sensitivität der analytischen Methode. Darüber hinaus ergibt sich aus der Summe der unterschiedlichen genotoxischen Substanzklassen und ihrer verschiedenen metabolischen Aktivierungswege eine Vielzahl von möglichen DNA-Addukten [7]. Daher bedarf es bei der Untersuchung von Adduktmustern aus komplexen Gemischen genotoxischer Schadstoffe, wie sie zum Beispiel Industrie- und Autoabgase oder Zigarettenrauch darstellen, einer ausgesprochen selektiven Analysenmethode, um nach Möglichkeit alle gebildeten DNA-Addukte ungeachtet ihrer diversen Natur (große, lipophile aromatische Kohlenwasserstoffe, kleinere Alkylantien usw.) trennen und simultan detektieren zu können.

Eine Trenntechnik, die diese Anforderungen zu erfüllen verspricht, ist die Mitte der achtziger Jahre von *Jorgenson* und *Lukacs* [8] eingeführte Kapillarelektrophorese. Diese analytische Methode zeichnet sich durch ein breites Anwendungsspektrum und verbunden mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion durch extreme Sensitivität aus. Darüber hinaus sind kapillarelektrophoretische Trennungen automatisierbar und eröffnen durch kurze Analysenzeiten verbunden mit verschiedenen Weiterentwicklungen wie zum Beispiel der Miniaturisierung auf Glas- oder Kunststoffchips die Möglichkeit eines sehr hohen Probendurchsatzes bei relativ niedrigen Kosten. Bedingt durch diese Eigenschaften konnte die Kapillarelektrophorese ihre Leistungsfähigkeit bereits bei der Entschlüsselung des genetischen Codes des Menschen unter Beweis stellen. Somit könnten DNA-Addukte als zusätzliche Biomarker in großangelegte molekularepidemiologische Studien miteinbezogen werden, was einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Krebsentstehung und der Aufklärung von lebensgewohnheitsbedingten Risikofaktoren bedeuten könnte.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Theoretischer Hintergrund – DNA-Addukte

#### 2.1.1 Chemische Kanzerogenese

Der Arzt und Naturforscher *Paracelsus* beschrieb um 1500 vermutlich erstmals den Zusammenhang zwischen einer chemischen Substanz und Krebs, in dem er eine Verbindung zwischen dem Lungenkrebs von Bergleuten und Rauschrot ( $\text{As}_4\text{S}_4$  oder Realgar) vermutete [3]. Der Engländer *Percival Pott* beschrieb 1775 den Ruß als Ursache für den Hautkrebs an Scrotum und Oberschenkeln der Londoner Schornsteinfeger und war damit der erste, der eine chemische Substanz als Krebsursache einer bestimmten Berufsgruppe zuordnete [9]. Der Beginn der experimentellen Krebsforschung Anfang des 20. Jahrhunderts brachte die Bestätigung der Beobachtung Potts, indem der japanische Pathologe *Yamagiwa* erstmals einen chemisch induzierten Krebs (Teerkrebs der Haut) im Tierexperiment erzeugen konnte [10].

Heutzutage werden chemische Kanzerogene entsprechend ihres Wirkmechanismus in zwei Kategorien unterteilt [3]: Die Gruppe der „genotoxischen Kanzerogene“ umfasst DNA-reaktive Substanzen, die mit der Erbsubstanz interagieren und dadurch mutagen wirken [11,12]. Hierbei kann man zwischen direkten Kanzerogenen, die ohne metabolische Aktivierung wie zum Beispiel Nitrosamide [3], oder indirekten Kanzerogenen, deren krebsauslösende Aktivität einer metabolischen Aktivierung bedarf [13], unterscheiden. Zu dieser letztgenannten Klasse gehören zum Beispiel polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe [14,15], aromatische Amine [16-18], Nitrosamine [19] und Naturstoffe wie manche Pilzgifte [20]. Die zweite Kategorie umfasst nicht-genotoxische, „epigenetische Kanzerogene“ wie zum Beispiel Asbest, DDT, Östradiol oder Butyl-hydroxyanisol, deren Wirkung vermutlich cytotoxischer, tumorpromovierender oder pseudohormoneller Natur ist. In letzter Folge beruht die krebsauslösende Wirkung dieser epigenetischen Kanzerogene auf einer gesteigerten Mutationsrate, oxidativer Schädigung der DNA, Veränderung der Genexpression oder Erhöhung der Proliferationsrate[21-25].

Es ist mittlerweile anerkannt, daß die Entstehung von Krebserkrankungen ein mehrstufiger Prozess ist, bei dem die schrittweise Schädigung der Erbsubstanz eine zentrale Stellung einnimmt. *Berenblum* und *Shubik* beschrieben 1949 ein Zwei-Stufen-Modell der chemischen Kanzerogenese [26], welches aus einer somatischen Mutation als tumorinitiierenden Schritt und der Tumorprogression durch ein epigenetisches Ereignis zur Stimulation der Zellteilung

besteht. Dabei proliferiert die initiierte Zelle unter Ausbildung eines Zellklons, der als benigner Tumor bezeichnet wird. Dieses klassische Modell aus Initiation und Promotion wurde erweitert durch den Begriff der Progression, der die Umwandlung des benignen Geschwulsts zu einem invasiven, metastasierenden Tumor durch die Anhäufung entsprechender genetischer Änderungen beschreibt. Dieses Modell von drei aufeinander folgenden Schritten der Krebsentwicklung hat sich mittlerweile als zu einfach erwiesen und ist durch ein mehrstufiges, bis zu sechs voneinander unabhängige genetische und epigenetische Ereignisse umfassendes Modell erweitert worden [2,27]. Dieses „multi-hit“-Konzept der chemischen Kanzerogenese ist in Abbildung 1 dargestellt. Dabei wird dem Umstand Rechnung getragen, daß Krebs erst durch eine Akkumulation von strukturellen Veränderungen der Erbsubstanz (Punktmutationen ausgelöst durch Karzinogen-DNA-Bindungen, Translocationen, chromosomalen Verlusten, somatischen Rekombinationen oder DNA-Methylierung) oder durch Veränderungen der Expression bestimmter Schlüsselgene entsteht [21,27-30].

Eine zentrale Stellung dabei nehmen Protoonkogene (Krebsgen-Vorläufer wie zum Beispiel *ras*) und Tumorsuppressorgene (tumorunterdrückende Gene wie zum Beispiel *p53*), sogenannte „critical target genes“ [27,31], ein. Diese Gene kodieren Proteine, die als Relais den Zellzyklus und das Zellwachstum regulieren. Fehlgeleitete Aktivierung von Protoonkogenen kann dabei zur Überexpression wachstumsfördernder Proteine, die die Zelle zu übermäßiger Vermehrung anregen, führen. Durch diese Disregulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung erhöht sich das Risiko neoplastischer Transformationen. Demgegenüber tragen Tumorsuppressorgene zur Krebsentstehung bei, wenn sie inaktiviert werden. Als Folge verliert die Zelle wichtige Proteine die als Wachstumsbremsen fungieren und sie normalerweise an einer unangemessenen Vermehrung hindern [32].

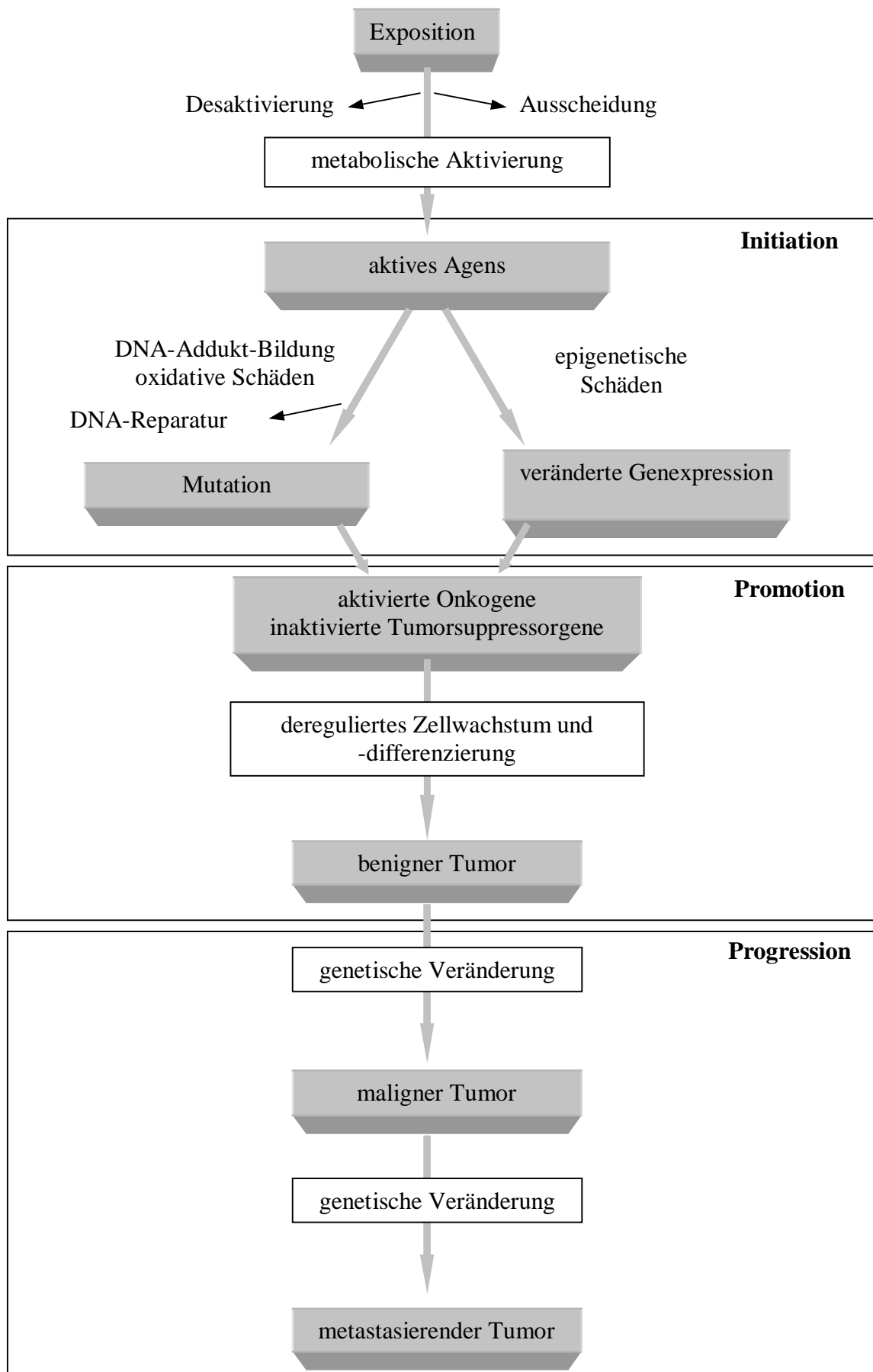


Abb. 1: Mehrstufenmodell der chemischen Kanzerogenese [2]

## 2.1.2 Metabolische Aktivierung chemischer Kanzerogene

Wie unter Abschnitt 2.1.1 beschrieben, werden chemische Kanzerogene in zwei Gruppen unterteilt. Der weitaus größere Teil dieser krebsauslösenden Noxen gehört zu den genotoxischen Kanzerogenen, die entweder direkt oder nach metabolischer Aktivierung mit zellulären Makromolekülen, insbesondere der DNA, interagieren und dadurch mutagen wirken.

Verantwortlich für die metabolische Aktivierung einer Noxe sind vor allem Enzyme, die Biotransformationen von xenobiotischen Stoffen katalysieren. Dabei werden kanzerogene Chemikalien als „Prokanzerogene“ durch metabolische Aktivierung in „proximale“ und letztendlich in „ultimale“ Kanzerogene umgewandelt. Diese so aktivierten elektrophilen Spezies reagieren mit nukleophilen Zentren wie DNA-Basen oder Proteinen unter Bildung kovalenter Modifikationen.

Allgemein kann man fremdstoffmetabolisierende Enzyme in zwei Kategorien einteilen [33]: Der *Phase-I*-Metabolismus führt unpolare, lipophile Stoffe in polare, hydrophilere Stoffe über. Dies kann oxidativ durch Epoxidierung, Hydroxylierung, N- oder S-Desalkylierung oder reduktiv durch Nitroreduktion oder Carbonylreduktion geschehen. Wichtigster Vertreter dieses Metabolismus-Systems ist die Cytochrom P450-Familie. Es existieren mindestens 40 unterschiedliche P450 Cytochrome in jeweils einer einzigen Spezies [7]. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Aktivierung von Kanzerogenen durch Cytochrom P450-Enzyme.

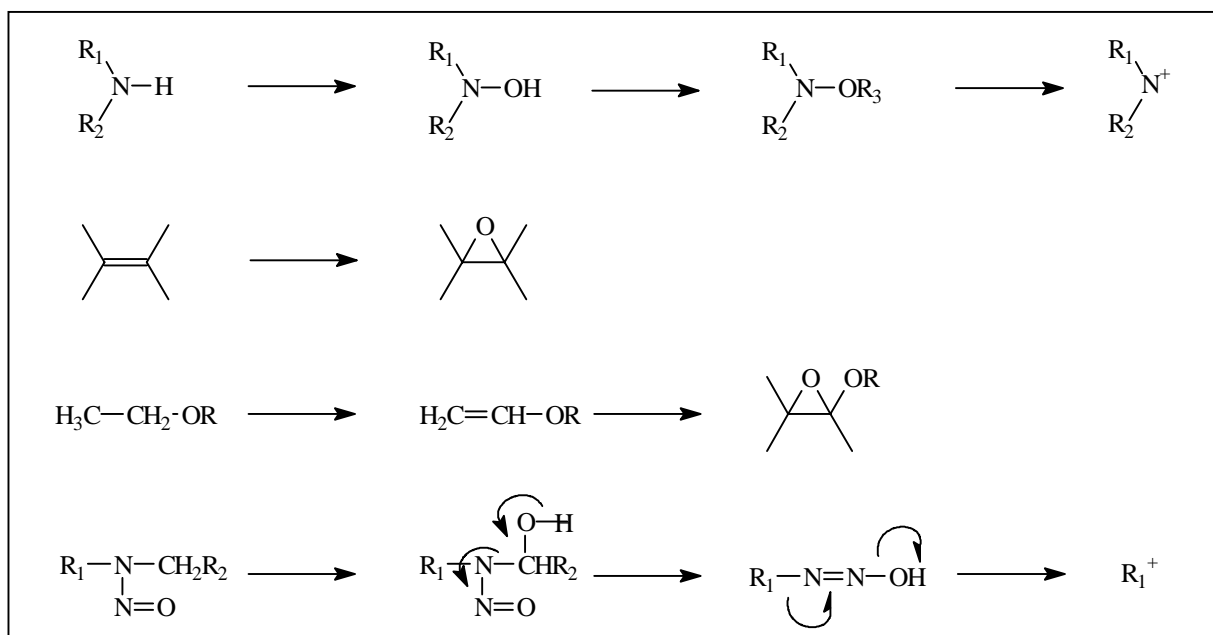


Abb. 2: Aktivierung von Chemikalien durch Cytochrom P450-Enzyme [7]

Enzyme des *Phase-II*-Metabolismus konjugieren Fremdstoffe oder Phase-I-Metabolite an hoch hydrophile, endogene Moleküle durch Glutathionkonjugation, Glucoronidierung, Acetylierung oder Sulfatierung, wodurch die Ausscheidung über Niere und Galle ermöglicht wird. Allerdings können auch Konjugate des Phase-II-Metabolismus aktivierte Spezies darstellen und als Elektrophile DNA-Addukte bilden. Ein Beispiel ist die Bildung eines N7-Guanyl-Adduktes durch die Aktivierung von Ethylendibromid durch Konjugation mit Glutathion, katalysiert durch Glutathion-S-Transferase [7].

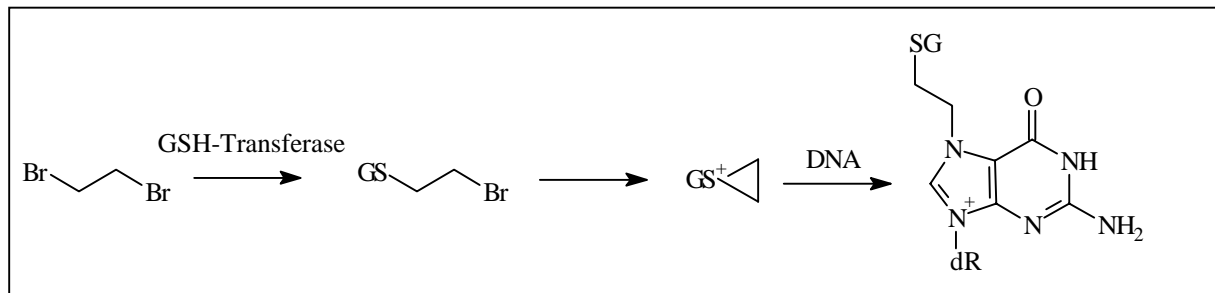


Abb. 3: Aktivierung von Ethylendibromid durch Phase-II-Metabolismus; GSH = Glutathion; dR = Desoxyribose

### 2.1.3 DNA-Addukte

*Auerbach et al.* [11] beschrieben 1947 bei Untersuchungen der Mutagenität von Senfgas in *Drosophila* die DNA als Target dieser Chemikalie. *Brookes* und *Lawley* [34] zeigten 1964 die Bindung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe an Nukleinsäuren von Mäusen und *Miller* [12] zeigte 1970, daß aromatische Amine ebenfalls kovalent mit der DNA reagieren. Die Reaktionsprodukte der DNA mit den Chemikalien werden als DNA-Addukte bezeichnet. Diese DNA-Addukte gelten als Vorläufer für Mutationen, da es im Zuge der Replikation an den Positionen dieser Modifikationen oder in ihrer unmittelbaren Nähe zu Basensubstitutionen oder Deletionen und Leserasterverschiebungen kommen kann [35-40]. Reaktionen von chemischen Kanzerogenen mit der DNA können zu einer Vielzahl unterschiedlicher Modifikationen der DNA führen. Für alkylierende Agentien zum Beispiel kommen 12 Positionen an den Nukleobasen und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat für die Alkylierung des DNA-Stranges in Frage. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die vier wichtigsten Möglichkeiten der Adduktbildung und die jeweiligen Angriffspunkte an den nukleophilen Zentren der vier Nukleobasen.



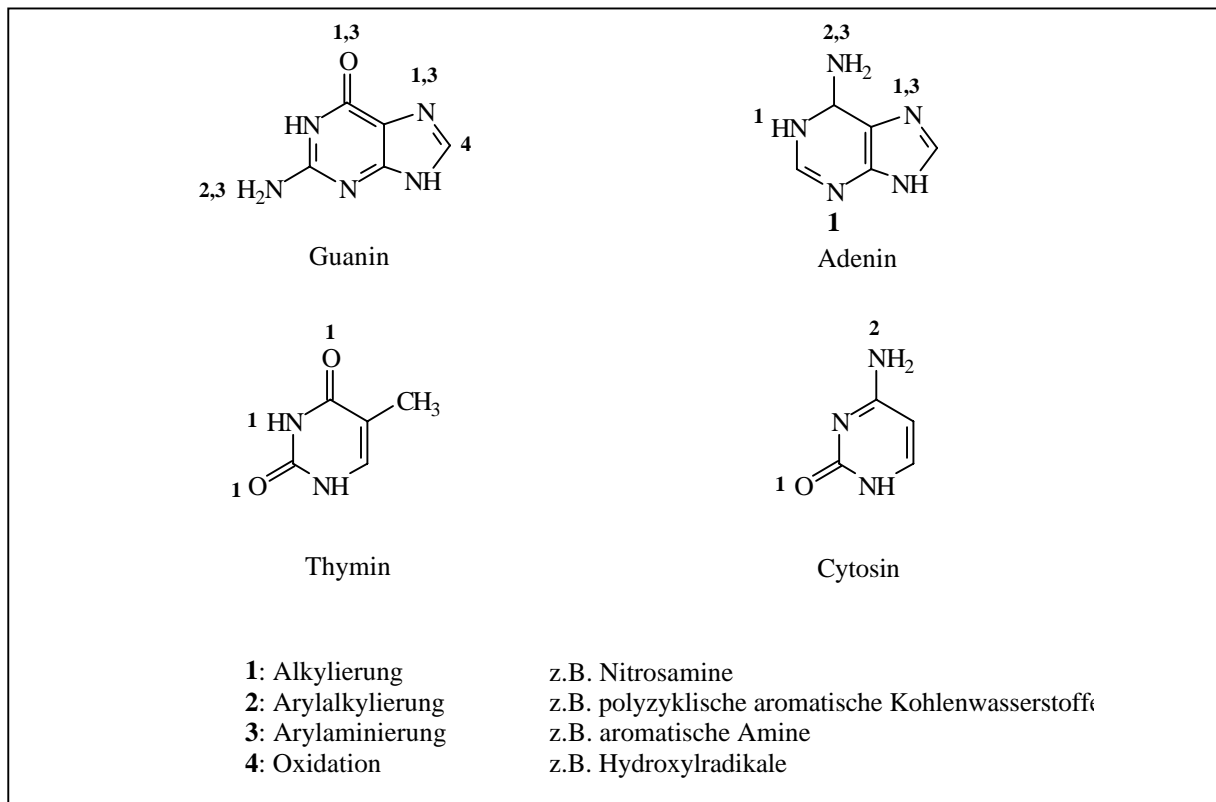


Abb. 4: Wichtige Adduktierungsreaktionen und die entsprechenden Angriffszentren der DNA-Basen

DNA-Addukt-bildende Substanzen können entsprechend ihres Ursprungs in endogene und exogene Risikofaktoren unterteilt werden [41]. Zu Beginn der Adduktforschung standen vor allem Umweltgifte im Mittelpunkt der Untersuchungen. Stetig verbesserte Nachweismethoden ermöglichen heutzutage allerdings auch die Detektion genotoxischer Nebenprodukte des normalen Metabolismus. Allerdings ist eine eindeutige Trennung zwischen diesen beiden Klassen nicht immer zu ziehen, da zum Beispiel manche Nitrosamine sowohl exogen vorkommen (Zigarettenrauch) als auch endogen gebildet werden können [3].

### 2.1.3.1 Exogene Kanzerogene

Die wichtigsten Vertreter dieser Kategorie sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, aromatische Stickstoffverbindungen, Alkylantien und manche Naturstoffe wie Mykotoxine oder Pflanzeninhaltsstoffe.

#### a) Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) sind ubiquitäre Umweltschadstoffe, die durch unvollständige Verbrennung von organischem Material entstehen. Sie sind beispielsweise enthalten in Teer, Ruß, Petroleum, Ölen, Autoabgasen und Tabakrauch [42].

Wichtigster Vertreter dieser Klasse ist das Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P), welches oxidativ durch das Cytochrom P450-Enzymsystem zu vier optisch aktiven 7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[*a*]pyren-7,8-diol-9,10-epoxiden aktiviert werden kann, die als ultimale Kanzerogene die DNA unter Bildung von N<sup>2</sup>-, N7-Guanyl- oder N<sup>6</sup>-Adenyl-Addukten angreifen können [3,7] (Abbildung 5).

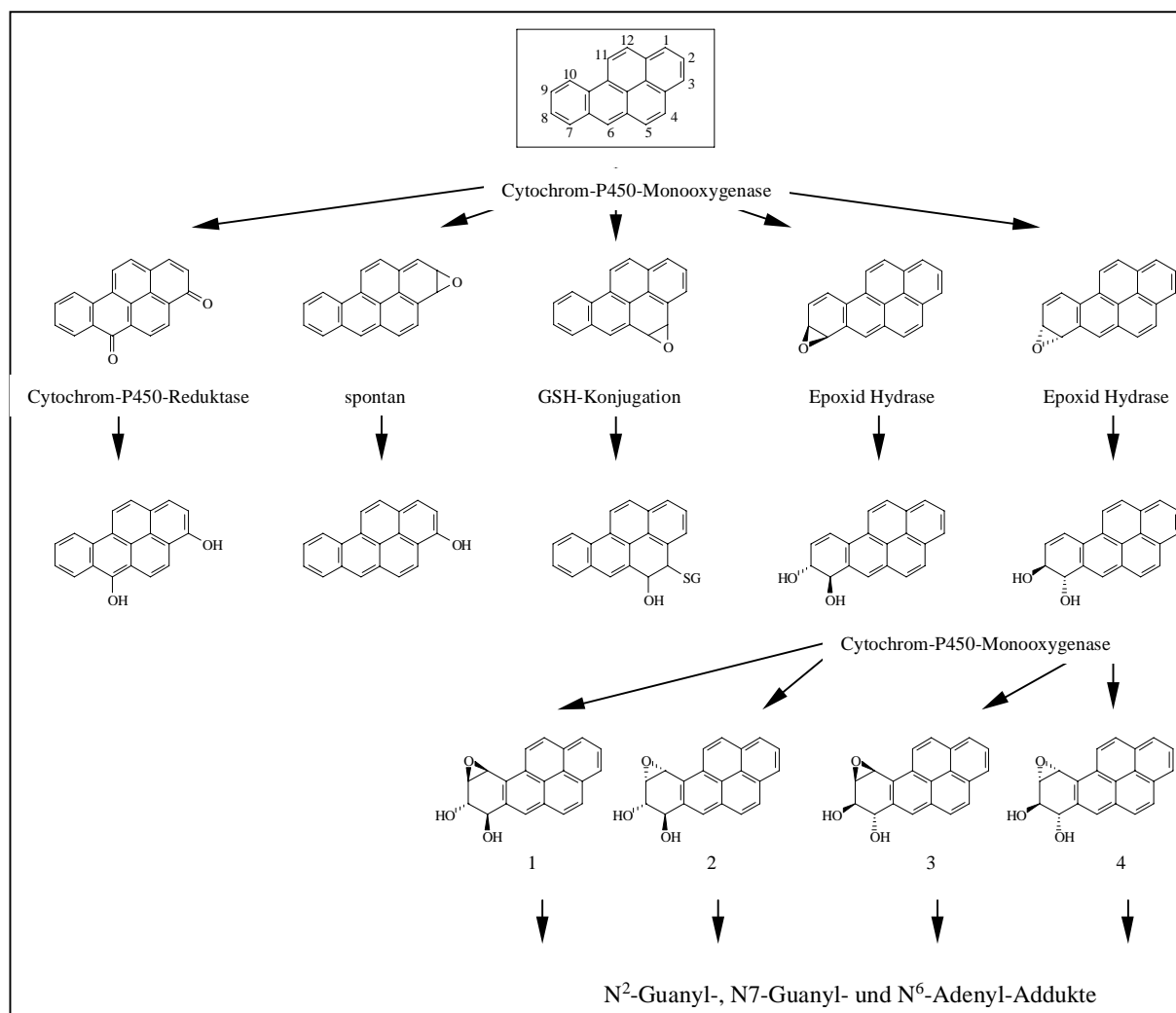


Abb. 5: Ausgewählte Stoffwechselvorgänge der metabolischen Umwandlung von Benzo[*a*]pyren; GSH = Glutathion; 1 = (+)(7R,8S,9R,10S)-dihydrodiolepoxid; 2 = (-)(7R,8S,9S,10R)-dihydrodiolepoxid (potentestes Karzinogen); 3 = (-)(7S,8R,9R,10S)-dihydrodiolepoxid; 4 = (+)(7S,8R,9S,10R)-dihydrodiolepoxid

Weitere Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe sind das 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen, 3-Methylcholanthren und 5-Methylchrysen. Die krebsauslösende Wirkung dieser Substanzklasse durch die Induktion von Mutationen im *ras*-Protoonkogen und die Bedeutung der PAH-DNA-Addukte bei Tumoren der Lunge durch Zigarettenrauch ist mittlerweile allgemein anerkannt [14,40].

### b) Aromatische Stickstoffverbindungen

Aromatische Stickstoffverbindungen lassen sich ihrerseits in Arylamine, heterozyklische aromatische Amine und aromatische Nitroverbindungen unterteilen:

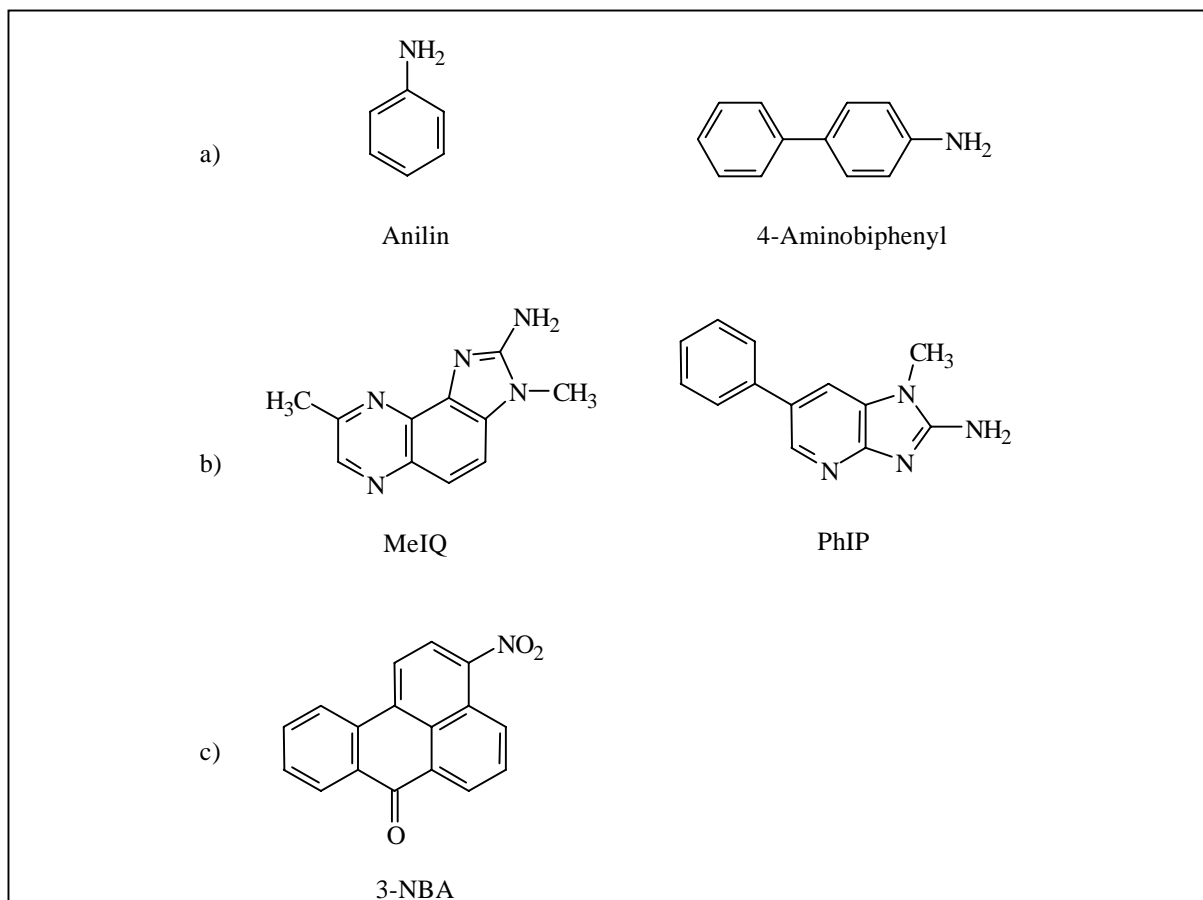


Abb. 6: Genotoxische aromatische Stickstoffverbindungen; a) Arylamine; b) heterozyklische aromatische Amine; c) aromatische Nitroverbindung; MeIQ = 2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]chinolin; PhIP = 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin; 3-NBA = 3-Nitro-7*H*-benz[*d,e*]anthracen-7-on (3-Nitrobenz-anthron);

Arylamine kommen in der Natur nicht vor sondern werden als Farbstoffe, für die Arzneimittelherstellung und als Antioxidantien synthetisch hergestellt. Zu ihnen gehören zum Beispiel Anilin, Aminofluoren, 4-Aminobiphenyl oder 6-Aminochrysen.

Die metabolische Aktivierung erfolgt in der Regel oxidativ über Cytochrom P450-katalysierte N-Hydroxylierung [7]. Die gebildeten N-Hydroxylamine bilden in sauren Medien direkt, nach erfolgter Sulfatisierung durch Sulfotransferasen oder nach Acetylierung durch N-Acetyltransferasen elektrophile Nitreniumionen, die als ultimale Kanzerogene DNA-Basen angreifen können:

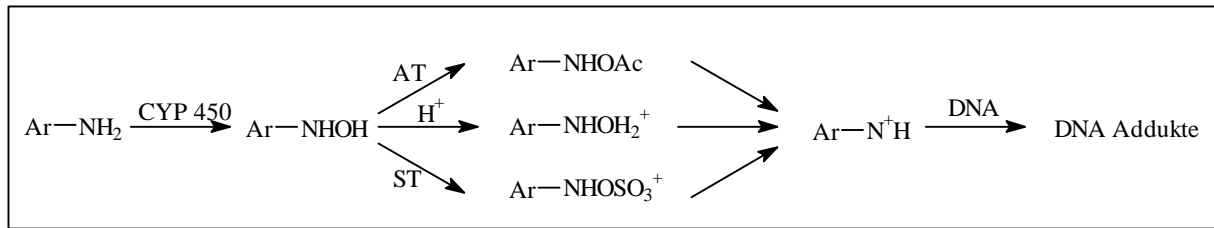


Abb. 7: Metabolische Aktivierung aromatischer Amine; AT = N-Acetyltransferase; ST = Sulfotransferase

Eine besondere Stellung hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Krebserkrankungen und Lebensgewohnheiten nehmen heterozyklische Amine ein [43]. Diese Substanzklasse, deren wichtigster Vertreter 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-*b*)pyridin (PhIP) ist, entsteht durch Pyrolyse von Aminosäuren und somit bei der Zubereitung von Fisch und Fleisch. So wurde die mutagene Wirkung von gekochtem Fisch und Rindfleisch bereits vor 20 Jahren im Ames-Test nachgewiesen [44,45]. Auch hier erfolgt der Angriff an die DNA-Basen über ein Nitrenium-Ion. Die bis heute charakterisierten Addukte heterozyklischer aromatischer Amine sind ausschließlich N<sup>2</sup>- und C8-Guanyl-Addukte [43].

Besonderes Interesse erlangte in jüngster Vergangenheit 3-Nitrobenzanthron als Umweltgift in Dieselabgasen. Diese Substanz zeigte im Ames-Test die höchste bisher gemessene Mutagenität aromatischer Mono-Nitroverbindungen [46]. *In vitro* erfolgt die Adduktbildung durch reduktive Aktivierung mittels Zink, Xanthinoxidase oder mittels Rattenleberhomogenat (S9-Mix) [47].

### c) Alkylantien

DNA alkylierende Substanzen finden besonders während der Chemotherapie von Krebspatienten Anwendung. So beruht die therapeutische Wirkung von *cis*-Diamindichlorplatin(II) (Cisplatin) auf der kovalenten Modifikation von Nukleobasen, indem es an die N7-Position von Guanin und Adenosin bindet [48,49]. Aufgrund der Quervernetzung zweier DNA-Stränge durch dieses Agens kommt es zu Strangbrüchen und einer Inhibierung der DNA-Replikation [50,51].

Alkylantien sind aber auch als Umweltgifte von Bedeutung. Abbildung 8 zeigt die alkylierende Wirkung von N-Nitrosoverbindungen aus Lösungsmitteln, Zigarettenrauch und Lebensmitteln nach metabolischer Aktivierung [4,19]:

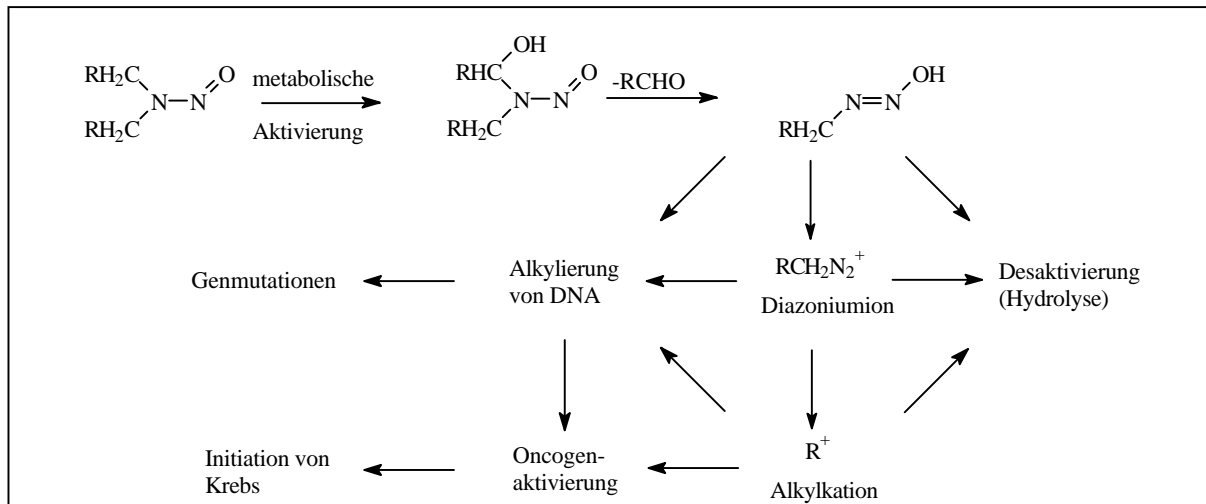


Abb. 8: Metabolismus und Adduktbildung von N-Nitroso-Verbindungen

#### d) Naturstoffe

Einige der potentesten Kanzerogene werden durch Mikroorganismen oder in Pflanzen gebildet. So ist das Stoffwechselprodukt des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus* Aflatoxin B<sub>1</sub> eines der wirksamsten Leberkanzerogene. Nach Epoxidierung durch das Cytochrom P450-Enzymsystem an Position 8,9 kommt es zur kovalenten Bindung an die DNA. Dabei entfallen in einem zellfreien *in vitro*-System ungefähr 90% der gesamten Aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA-Bindung auf das N7-Guanyl-Addukt [52], welches zu einer stärker persistierenden Pyrimidin-Form hydrolysiert werden kann [53] (Abbildung 9).

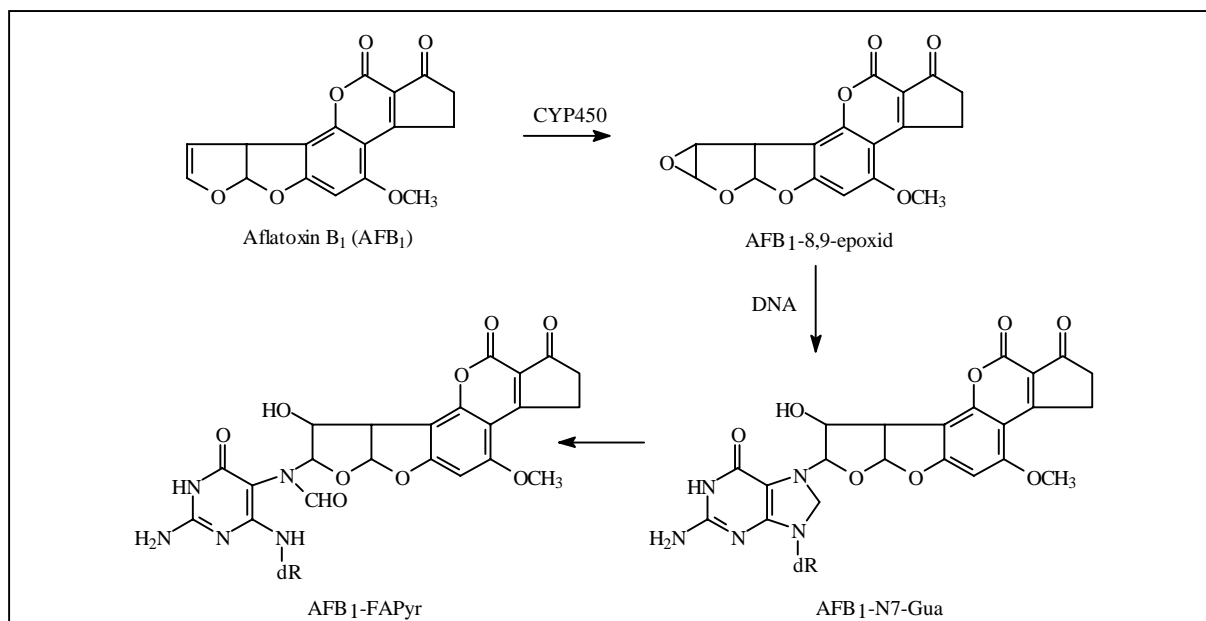


Abb. 9: Metabolische Aktivierung durch Cytochrom P450 und Adduktbildung von Aflatoxin B<sub>1</sub>; AFB<sub>1</sub>-N7-Gua = 8,9-Dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxyaflatoxin B<sub>1</sub>; AFB<sub>1</sub>-FAPyr = 2,3-Dihydro-2-(N<sup>5</sup>-formyl-2,5,6-triamino-4-oxypyrimidin-N<sub>5</sub>-yl)-3-hydroxyaflatoxin B<sub>1</sub>; dR = Desoxyribose

Zu den pflanzlichen Karzinogenen werden unter anderem Safrol und Aristolochiasäure, ein Inhaltsstoff der Aristolochiaceen gezählt. Letztere wird reduktiv durch Nitroreduktasen metabolisch aktiviert [54] und bildet N<sup>6</sup>-Adenin- und N<sup>2</sup>-Guanin-Addukte [55] (Abbildung 10). Diese DNA-Addukte sind in der Lage, in der Ratte Mutationen im Protoonkogen *H-ras* zu induzieren [56] und eine tumorauslösende Wirkung im Harnleiter beim Menschen wird aktuell diskutiert [57].

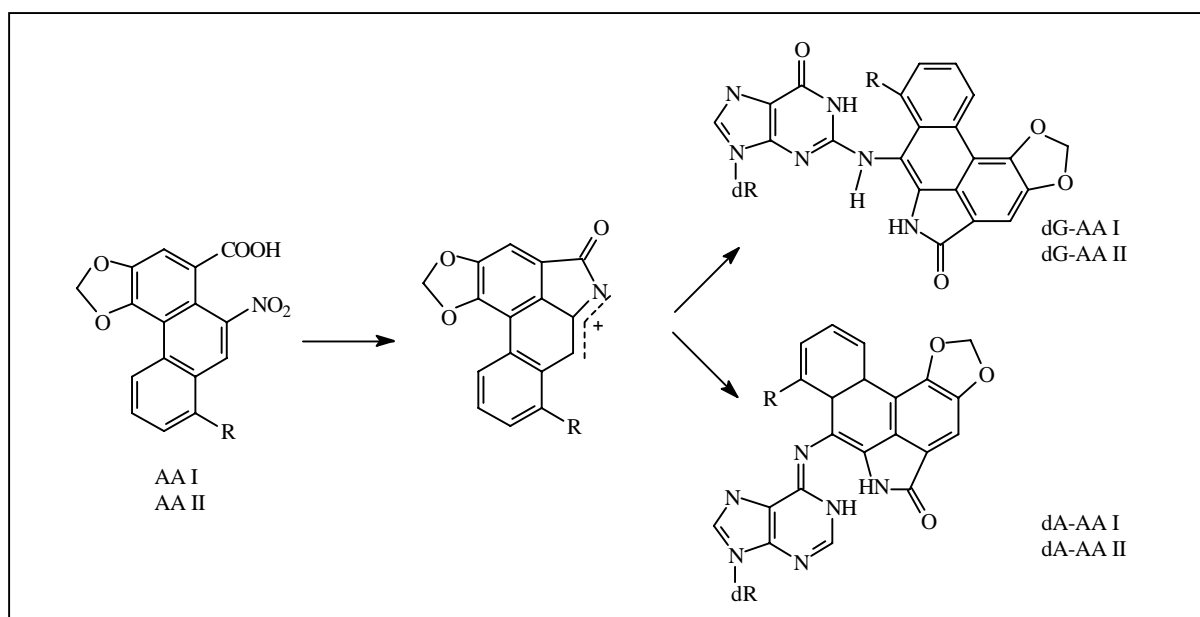


Abb. 10: Mechanismus der Adduktbildung der Aristolochiasäure und Struktur der Addukte; AA I = Aristolochiasäure I [R = OCH<sub>3</sub>]; AA II = Aristolochiasäure II [R = H]; dG-AA I,II = 7-(2'-Desoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-aristolactam I,II; dA-AA I,II = 7-(2'-Desoxyadenosin-N<sup>6</sup>-yl)-aristolactam I,II

### 2.1.3.2 Endogene DNA-Addukte

Durch Verbesserungen auf dem Gebiet der DNA-Addukt-Analytik stehen chemische Modifikationen der DNA-Basen ausgelöst durch normale physiologische Prozesse vermehrt im wissenschaftlichen Interesse. Die Substanzen endogenen Ursprungs umfassen Oxidantien, Produkte der Fettsäureoxidation, reaktive Stickstoffspezies und Intermediate unterschiedlicher Metabolisierungswege [41]. So wurden bei der Untersuchung der Kanzerogenität von Vinylchlorid und Ethylcarbamat strukturell verwandte DNA-Addukte in Kontrolltieren gefunden [58]. Auch wenn viele endogene Substanzen kein akutes toxisches Potential besitzen, wird ihr schädigender Beitrag aufgrund der lebenslangen Exposition diskutiert [59].

#### a) DNA-Schädigung durch endogene Oxidantien

Oxidative Schädigung der DNA liefert den Hauptanteil der endogenen DNA-Schädigungen [60]. So beträgt die Menge an ausgeschiedenen oxidierten Nukleobasen in der Ratte 70000 Addukte pro Zelle pro Tag [61]. Diese oxidativen Veränderungen werden vermutlich hervorgerufen durch Superoxidanionradikale ( $O_2^{\bullet-}$ ) und Wasserstoffsuperoxid ( $H_2O_2$ ) [41]. So kann  $H_2O_2$  zum Beispiel durch Monoaminoxidasen des Neurotransmitterkatabolismus gebildet werden [62]. In *Escherichia coli* konnte auch gezeigt werden, daß Mutanten, die defizient an sauerstoffradikal-abfangenden Proteinen wie Superoxiddismutase oder Katalase sind, eine erhöhte Rate an Spontanmutationen aufweisen [63-65]. Ein Hauptprodukt oxidativer DNA-Schädigungen ist 8-Oxo-2'-desoxyguanin (8-oxo-dGua) [60] (Abbildung 11), aber auch 2-Hydroxy-2'-desoxyadenin (2-OH-dAde) [66] und 5-Hydroxy-2'-desoxycytidin und seine Desaminierungsprodukte 5-Hydroxyuracil und Uracilglykol konnten nachgewiesen werden [67].

#### b) DNA-Schädigung durch Fettsäureoxidation

Ungesättigte Fettsäuren stellen im Vergleich zur DNA bedeutend bessere Targets für Oxidantien dar. Allerdings löst die Oxidation dieser Substanzen eine autokatalysierte Reaktionskaskade aus, bei der zahlreiche genotoxische Substanzen gebildet werden können [68]. Unter diesen Fettsäuremetaboliten nimmt Malondialdehyd und verschiedene 4-Hydroxy-2-alkenale (z. B. 4-Hydroxy-2-nonenal) oder 2-trans-Alkenale (z.B. Acrolein und Crotonaldehyd) eine bedeutende Stellung ein. In Anwesenheit von Hydroperoxiden können diese Enale epoxidiert werden und exozyklische Etheno-Addukte mit Guanin, Adenin (Abbildung 11) und Cytosin bilden [69,70].

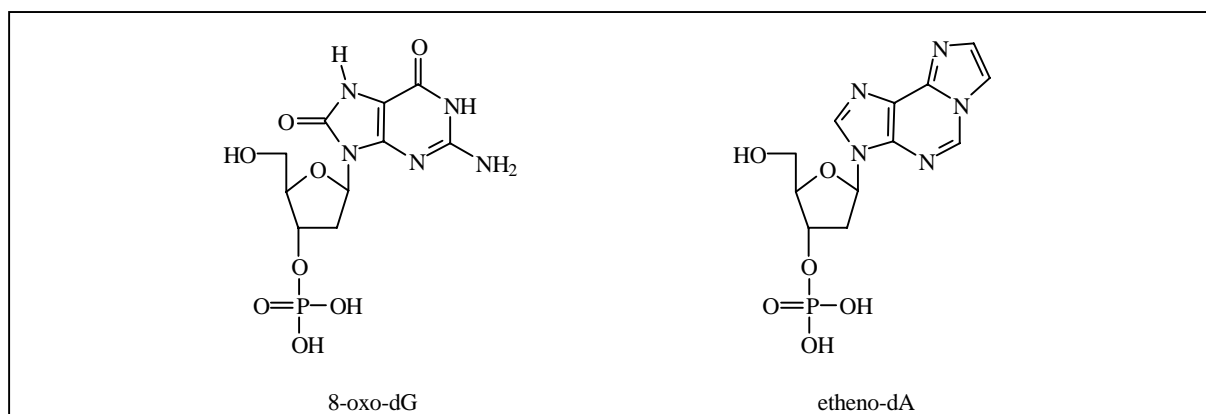


Abb. 11: Strukturen der wichtigsten DNA-Addukte durch oxidative Schädigung und Fettsäureoxidation; 8-oxo-dG = 8-Oxo-2'-desoxyguanosin-3'-monophosphat; etheno-dA = 1,N<sup>6</sup>-etheno-2'-desoxyadenosin-3'-monophosphat

### 2.1.3.3 DNA-Methylierung

Die einzige natürlich vorkommende Modifikation der DNA in Eukaryonten ist die Methylierung der Position 5 von Cytosin unter Bildung von 5-Methylcytosin [71]. Die Methylierung von Cytosin erfolgt enzymatisch unmittelbar nach der DNA-Synthese durch die (Cytosin-5)-methyltransferase (Mtase) [72]. Dabei ist die Lage des 5-Methylcytosins nicht beliebig. Man findet es vorrangig, wenn das C direkt einem G vorangeht. Etwa 70% dieser sogenannten CpG-Islands sind in eukaryontischer chromosomaler DNA methyliert [71,72]. Daraus ergibt sich ein Gesamtgehalt an 5-Methylcytosin von 3 bis 10% aller Cytosine in Säuger-DNA [73]. Dem Methylierungsgrad wird eine bedeutende Funktion bei der Genexpression und Zelldifferenzierung zugesprochen. So ist der Methylierungsgrad aktiv transkribierter Gene wie zum Beispiel jenen für Globin deutlich niedriger. Die geringere Methylierung aktiv transkribierter Gene bewirkt wahrscheinlich eine Veränderung der DNA-Struktur, so daß sie für aktivierende Proteine leichter zugänglich wird [74,75]. Da das Methylierungsmuster in verschiedenen Organen bei einer hohen interindividuellen Übereinstimmung unterschiedlich ist [76,77], geht man von einer Bedeutung der Methylierung für die Aufrechterhaltung des jeweiligen Differenzierungsstatus aus [78].

Die Analyse von DNA aus Tumorgewebe ergab, daß sowohl epigenetische wie genetische Veränderungen an den Zielsequenzen der Mtase (CpG-Islands) zwei der häufigsten und konsistentesten Veränderungen von Tumorzellen darstellen [79-81]. So ist der Gehalt an mRNA der Mtase sowie deren Enzymaktivität in Tumorzellen deutlich höher als in normalen Zellen [82]. Dennoch findet man in Tumorzellen sowohl Hypo- wie Hypermethylierung [83]. Als genetische Veränderung findet man erhöhte Mutationsraten an CpG-Islands in *p53*- und *p16*-Genen [84]. Darüber hinaus wird davon ausgegangen, daß ungefähr 30 % aller ererbten Mutationen der Keimbahnen sich an den CpG-Islands befinden [80]. Eine Übersicht der möglichen genetischen Änderungen ist in Abbildung 12 dargestellt.



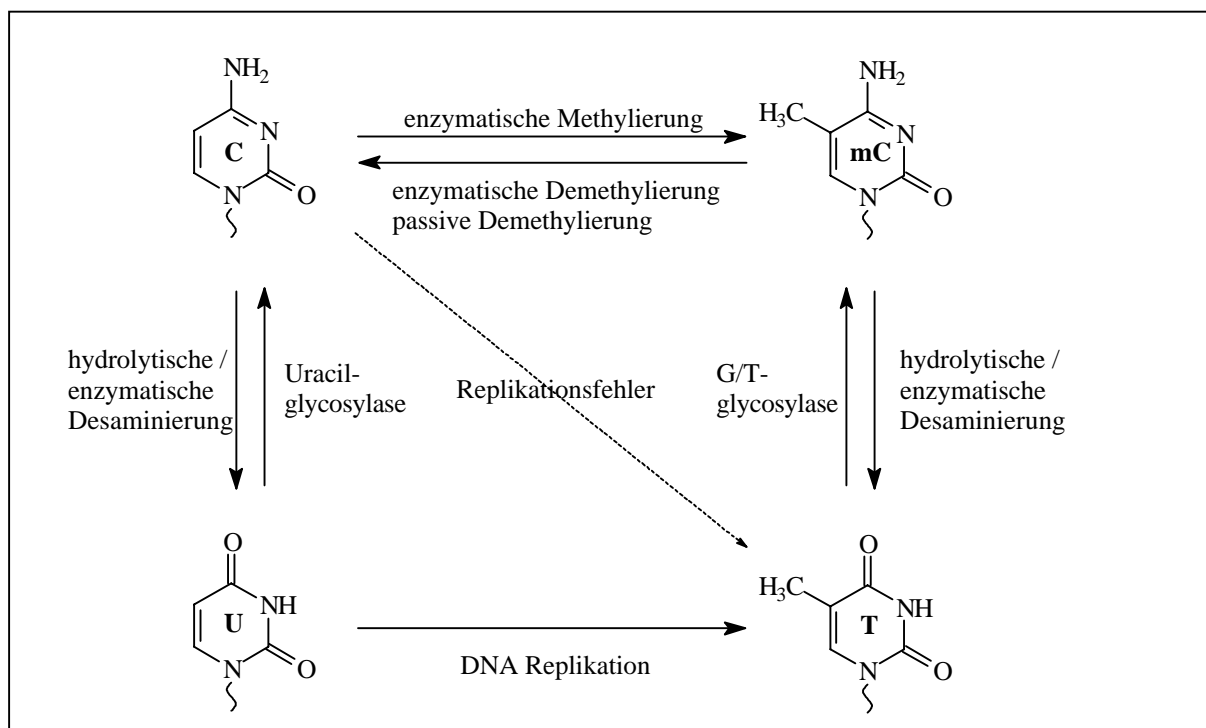


Abb. 12: Genetische Veränderungen durch DNA-Methylierung; C = Cytosin; mC = 5-Methylcytosin; T = Thymidin; U = Uracil

#### 2.1.4 Nachweismethoden für DNA-Addukte

In den letzten zwanzig Jahren wurden spezifische und sensitive Nachweismethoden für DNA-Addukte entwickelt [85]. Diese Nachweismethoden umfassen Immunoassays [86-89], radioaktive Markierungen wie das  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahren [90-93], Fluoreszenz- und Phosphoreszenzspektroskopie [94-96], elektrochemische Detektion [97] und Massenspektrometrie [95,98]. Jede Methode zeichnet sich durch spezielle Vor- aber auch Nachteile aus. So wurden die entwickelten Methoden zumeist erfolgreich in Tiermodellen eingesetzt, bei denen das Adduktum einer einzigen verabreichten Verbindung untersucht wurde. Humanproben jedoch zeichnen sich durch ein wesentlich komplexeres Adduktspektrum aus, was zum Beispiel eine exakte Quantifizierung spezieller Addukte deutlich erschwert [85]. Dennoch konnte mit den bislang entwickelten Techniken eine Vielzahl von DNA-Addukten identifiziert und chemisch charakterisiert werden.

Eine Übersicht über verschiedene Methoden zum Nachweis von DNA-Addukten aus genomischer DNA ist in Tabelle 1 gegeben.

<b>Methode</b>	<b>Nachweisgrenze (fmol, <math>1 \cdot 10^{-15}</math> mol)</b>	<b>Addukte / Nukleotide</b>	<b>benötigte DNA- Menge(µg)</b>
<i>Radioaktivmarkierung (<math>^{32}\text{P}</math>-postlabeling)</i>			
Standardmethode	10	1 in $10^7$	1-10
Nuklease P1- oder Butanolanreicherung	0,01	1 in $10^{10}$	1-10
<i>Immunoassay</i>			
RIA	40	1 in $10^8$	bis zu 10000
ELISA (kompetitiv)	1	1 in $6 \cdot 10^8$	50
ELISA (non-kompetitiv)	3	1 in $10^7$	0,1
USERIA	1	1 in $10^7$	25
Slot-blot	1	1 in $3 \cdot 10^6$	1
<i>Fluoreszenzmethoden</i>			
SFS	20	1 in $5 \cdot 10^8$	100
FLNS	1	1 in $10^8$	1000
<i>physiko-chemisch</i>			
GC/MS	0,5	-	-
HPLC/UV	100000	1 in $10^5$	1000
HPLC/FL	50	1 in $10^7$	100

Tab. 1: Methoden zum Nachweis von DNA-Addukten [97]; RIA = Radioimmunoassay; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; USERIA = ultrasensitive enzymatic radioimmunoassay; SFS = synchronous fluorescence spectrophotometry; FLNS = fluorescence-line-narrowing spectroscopy; GC/MS = Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion; HPLC = high performance liquid chromatography; UV = Ultraviolett-Detektion; FL = Fluoreszenz-Detektion

Die zur Zeit wohl empfindlichste Methode zum Nachweis von DNA-Addukten ist das Anfang der achtziger Jahre entwickelte  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahren [6,93,100-102]. Adduktisierte DNA wird nach ihrer Isolierung enzymatisch zu Mononukleotiden hydrolysiert. Im allgemeinen wird Mikrokokkennuklease (MN) und Milzphosphodiesterase (SPD) zum Verdau der DNA eingesetzt, was zur Bildung sowohl der adduktisierten wie unmodifizierten Mononukleosid-3'-monophosphate führt. Im Anschluß an diese Hydrolyse wird auf die freie 5'-OH-Gruppe der Desoxyribose mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase eine  $^{32}\text{P}$ -markierte Phosphatgruppe aus  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Adenosin triphosphat}$  übertragen (Abbildung 13).

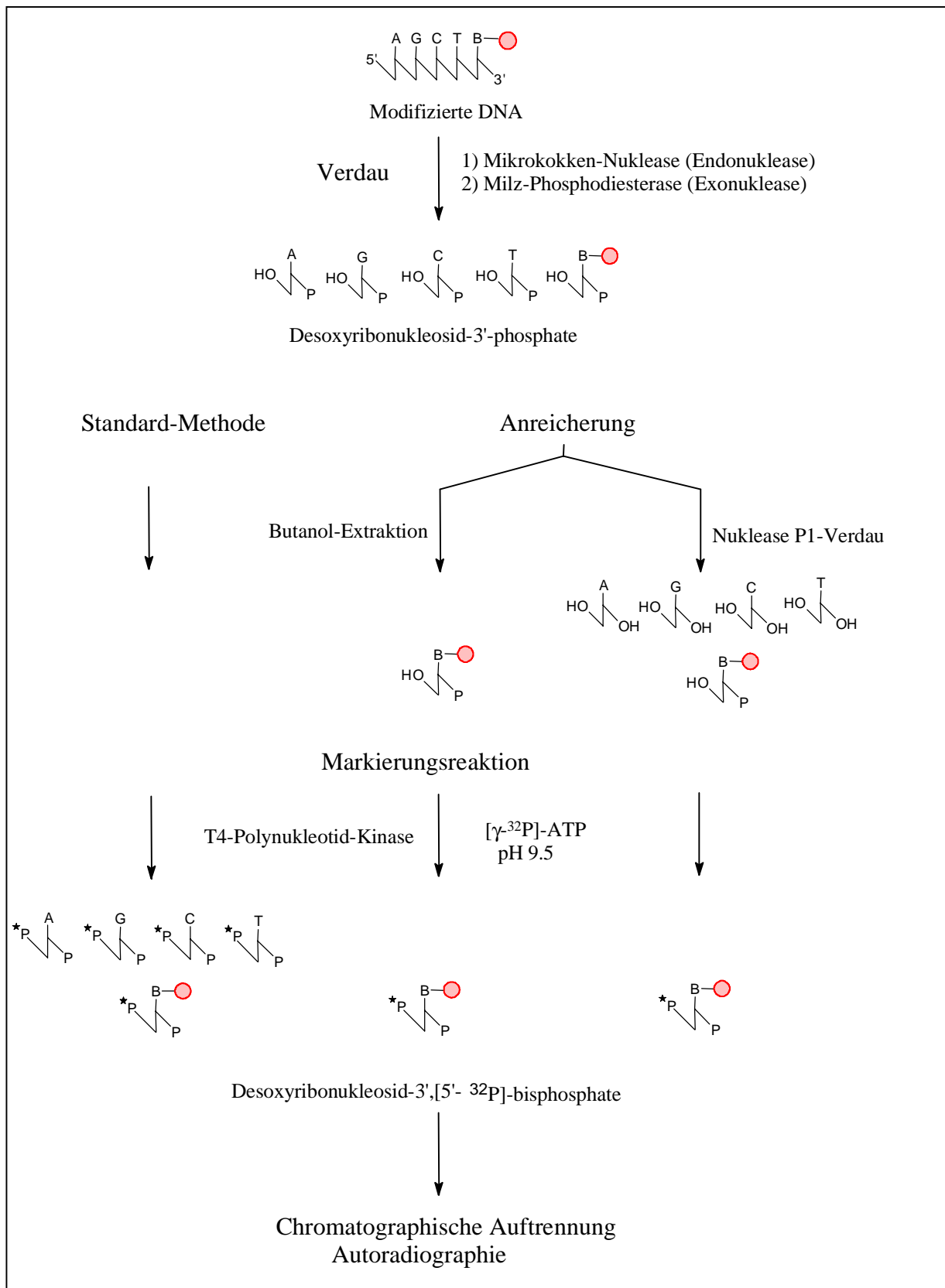


Abb. 13: Schematischer Ablauf des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahrens

Die so entstandenen radioaktivmarkierten Mononukleotid-3'-5'-bisphosphate werden durch mehrdirektionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und autoradiographisch

entwickelt. Dadurch erhält man distinkte Addukt-Spots mit definiertem Laufverhalten, die durch cochromatographischem Vergleich mit Standardverbindungen bestimmten Kanzerogenen zugeordnet werden können. Alternativ können die markierten Nukleotide auch mittels HPLC aufgetrennt und durch on-line-Radioaktivitäts-Detektion bestimmt werden. Eine kapillarelektrophoretische Auftrennung derart gelabelter Verbindungen sowie deren Detektion und Quantifizierung nach erfolgtem Blotting ist ebenfalls beschrieben [103].

Die Empfindlichkeit des Standardverfahrens von 1 Addukt in ca.  $10^8$  unmodifizierten Nukleotiden ist durch Anreicherungsverfahren, die dem radioaktiven Markierungsschritt vorausgehen, um zwei Zehnerpotenzen verbessert worden. So können hydrophobe Addukte durch Extraktion mit n-Butanol aus der wäßrigen Phase ausgeschüttelt und somit angereichert werden [102]. Die Phosphataseaktivität der Nuklease P1 aus *Penicillium citrinum* kann ebenfalls zur Anreicherung ausgenutzt werden [6]. Dieses Enzym dephosphoryliert unmodifizierte Mononukleotide, während es die Mehrzahl der adduktierten Nukleotide nicht als Substrat akzeptiert. Dephosphorylierte Nukleoside erkennt die markierende T4-Polynukleotidkinase allerdings nicht mehr als Substrat, wodurch überwiegend nur die modifizierten Basen, die als Nukleosid-3'-phosphate vorliegen, gelabelt und anschließend detektiert werden. Mit dieser universell anwendbaren Methode sind Addukte aller wichtigen genotoxischen Substanzklassen wie Arylamine, Nitroaromaten, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, heterozyklische Amine und Alkylantien nachgewiesen worden [90]. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, daß sie auch für noch unbekannte Addukte verwendet werden kann und somit zur Untersuchung des genotoxischen Potentials chemischer Substanzen geeignet ist. Allerdings besitzt diese Methode auch entscheidende Nachteile, die sie für eine universelle Anwendung nicht geeignet erscheinen lassen. So erhält man zwar durch das Laufverhalten der modifizierten Nukleotide bei der Dünnschichtchromatographie und der Sensitivität der Addukte gegenüber den unterschiedlichen Anreicherungsverfahren Rückschlüsse auf die Natur und die Position der Modifikationen, eine strukturelle Aufklärung ist jedoch nicht möglich. Zudem müssen die dünnschichtchromatographischen Trennbedingungen der chemischen Natur der zu untersuchenden Modifikation angepasst werden, womit eine simultane Untersuchung von Addukten unterschiedlicher genotoxischer Substanzklassen nicht durchführbar ist. Ein weiterer Nachteil besteht in der Fülle der enzymatischen Schritte, die bei diesem Verfahren aufeinanderfolgen. Da eine unterschiedliche Enzymaktivität dieser Schritte für unterschiedliche Modifikationen gegeben ist, gestaltet sich die Quantifizierung als problematisch [90]. Gegen eine universelle Anwendung spricht aber vor allem die Verwendung radioaktiver Isotope und die damit verbundenen Anforderungen an

Arbeitssicherheit und Abfallentsorgung. Darüber hinaus ist die mehrdirektionale Dünnschichtchromatographie arbeitsintensiv und nicht automatisierbar.

Methoden, die sich fluoreszenzspektroskopischer Nachweismethoden bedienen wie FI- oder SFS-Spektroskopie besitzen ebenfalls die erforderlichen Nachweisgrenzen. Allerdings sind diese Verfahren in ihrem Anwendungsspektrum limitiert, da nicht alle DNA-Addukte beziehungsweise modifizierte Spezies fluoreszieren.

Bei den immunologischen Verfahren werden mono- oder polyklonale primäre Antikörper eingesetzt, die gegen spezifische Basenmodifikationen gerichtet sind. Zur Detektion dieses Addukt-Antikörper-Komplexes wird dann ein sekundärer, radioaktiv- (RIA, USERIA) oder fluoreszenzmarkierter (ELISA) Antikörper eingesetzt. Dabei stellen Kreuzreaktionen und die Verfügbarkeit der Antikörper die limitierenden Faktoren dar.

## **2.2 Theoretischer Hintergrund – Kapillarelektrophorese**

### **2.2.1 Historische Entwicklung**

Vor über 100 Jahren wurde das Gesetz der unabhängigen Ionenwanderung (1. Gesetz von *Kohlrausch*) formuliert [104]:

Geladene Teilchen wandern in Lösung unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.

Verantwortlich für die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten sind entweder Unterschiede in den Ladungsdichten der Moleküle und der daraus resultierenden unterschiedlich starken Beschleunigung im elektrischen Feld oder unterschiedliche Reibungswiderstände, die der Wanderung entgegenwirken.

Unter dem Begriff *Elektrophorese* versteht man nun die unterschiedliche Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld.

*Tiselius* führte die Elektrophorese als Trenntechnik im Jahre 1937 ein [105]. Plaziert man in einem Tubus Proteinmischungen zwischen Elektrolytlösungen und legt ein elektrisches Feld an, so stellte er fest, daß Proteine in Richtungen und mit Geschwindigkeiten wandern, die durch ihre Ladung und Mobilität bestimmt werden. Für seine Arbeiten auf dem Gebiet der Trenntechnik insbesondere der Serumproteine des Blutes erhielt *Tiselius* 1948 den Nobelpreis für Chemie.

Die Trennleistung elektrophoretischer Trennungen in Lösung, wie von *Tiselius* durchgeführt, ist durch thermische Diffusion und Konvektion stark begrenzt. Aus diesem Grund werden Gele oder mit Elektrolytlösung imprägnierte Papierstreifen eingesetzt. Die traditionelle Elektrophorese verwendet anti-konvektive Medien wie Polyacrylamid- oder Agarosegele, mit denen Biopolymere, die als Polyanionen oder –kationen mit gleichem Oberflächen-Ladungsverhältnis vorliegen, aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe getrennt werden können. Obwohl die klassische Elektrophorese gerade auf dem Gebiet der Protein- oder Nukleinsäuretrennung weit verbreitet ist, zeichnet sich ihre Anwendung durch bedeutende Nachteile aus:

- Quantitative Analysen sind nur mit Remissionsmessungen möglich, wobei z. B. Proteine erst nach Anfärbung und somit fehlerbehaftet ausgewertet werden können.
- Um ein Austrocknen der Gele durch zu hohe Joulesche Wärme zu vermeiden, dürfen nur relativ kleine Spannungen angelegt werden. Dies hat relativ lange Analysenzeiten und geringe Effizienzen zur Folge.
- Trennungen über Flachbett-Gelelektrophorese sind nicht automatisierbar.

Eine Alternative zum Flachbett-Format ist, die elektrophoretischen Trennungen in engen, offenen Rohren beziehungsweise Kapillaren durchzuführen. Die erste Trennung in einer offenen Glasröhre wurde 1967 von *Hjertén* beschrieben [106], der die thermische Stabilisierung der Lösung durch Rotation der Röhre um seine eigene Achse erreichte. Gegen Ende der 70er Jahre führten *Mikkers*, *Everaerts* und *Verheggen* Trennungen in Glas- und Teflon-Kapillaren mit Innendurchmessern von 200 bis 500µm durch [107]. In den frühen 80er Jahren entwickelten *Jorgenson* und *Lukacs* diese Technik durch die Verwendung von aus der Gaschromatographie bekannten fused-silica-Kapillaren weiter [8,108,109,110]. Diese Kapillaren mit Innendurchmessern von 50 bis 200µm ermöglichten hocheffiziente Trennleistungen durch das günstigere Oberflächen-Volumen-Verhältnis und der daraus resultierenden starken Verminderung der störenden thermisch induzierten Konvektion. Desweiteren ermöglichen diese Quarzkapillaren den Einsatz von aus der HPLC bekannten on-line-Detektoren zum direkten Nachweis in der Kapillare. *Jorgenson* beschrieb zudem die Theorie und die Zusammenhänge zwischen Trennleistung und Trennparametern, so daß diese Arbeiten als der Beginn der Kapillarelektrophorese in ihrer heutigen Form gelten.

Die Kapillarelektrophorese kann als eine instrumentelle Besonderheit der Elektrophorese bezeichnet werden und viele Fortschritte, die sich durch die Verwendung von Kapillaren

anstelle von Flachbett-Gelen ergeben haben sind vergleichbar mit jenen, die durch die Verwendung von Säulen statt beschichteten Dünnschichtplatten auf dem Gebiet der Chromatographie erzielt wurden. Die Verwendung von Kapillaren erweiterte darüber hinaus das Anwendungsspektrum der Elektrophorese über das Feld der Trennung von Makromolekülen hinaus bis hin zur simultanen Analyse kleiner Kationen, Anionen und sogar neutraler Moleküle.

### 2.2.2 Apparativer Aufbau

Der schematische Aufbau einer Kapillarelektrophorese ist in Abbildung 14 dargestellt:

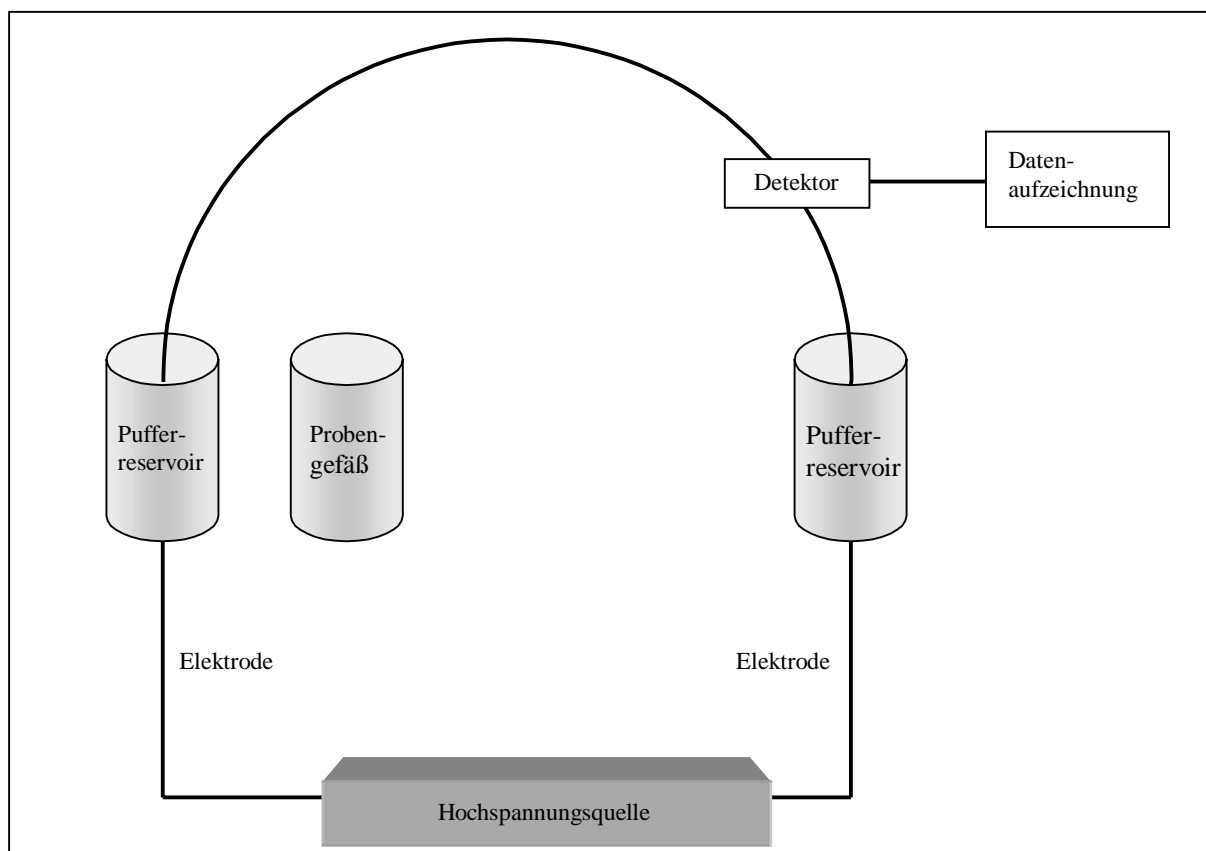


Abb. 14: Schematische Darstellung einer Kapillarelektrophoreseapparatur

Bei der Kapillarelektrophorese erfolgt die Trennung in Polyimid-beschichteten Kapillaren mit typischerweise 25 bis 75µm Innendurchmesser und 30 bis 100cm Länge. Aufgrund ihres hohen elektrischen Widerstandes ermöglichen Kapillaren Trennspannungen von bis zu 30000 Volt. Darüber hinaus erlaubt das günstige Oberflächen-Volumen-Verhältnis eine effektive Abführung der bei diesen Spannungen entstehenden Jouleschen Wärme mittels Flüssigkeits- oder Luftkühlung.

Die puffergefüllte Kapillare taucht in die Pufferreservoirs ein, die über Elektroden mit einer Hochspannungsversorgung verbunden sind. Zur Probenaufgabe wird am Kapillarinlet das Pufferreservoir durch ein Probengefäß ausgetauscht und durch Anlegen eines Druckes oder eines elektrischen Feldes die Probe injiziert. Nach dem Austausch des Probengefäßes durch das Puffergefäß wird ein elektrisches Feld angelegt, wodurch die Probenkomponenten unterschiedlich schnell in Richtung Kapillaroutlet migrieren und mittels eines on-line-Detektors qualitativ und quantitativ ausgewertet werden können.

## 2.2.3 Grundlagen

### 2.2.3.1 Elektrophoretische Mobilität

Elektrophoretische Trennungen beruhen auf unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten gelöster Ionen in einem elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit der Ionen ist abhängig von ihrer Ladung und Geometrie. Desweiteren hängt sie von der Temperatur, dem pH-Wert und der Viskosität des Trennmediums und der applizierten Feldstärke ab.

$$(2.1) \quad v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \frac{z_i e_0 E}{6\pi\eta r_i}$$

$v_{ep}$  = elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit;  $\mu_{ep}$  = elektrophoretische Mobilität;  $E$  = Feldstärke;  $z_i$  = Ladungszahl des Teilchens;  $e_0$  = elektrische Elementarladung;  $\eta$  = Viskosität;  $r_i$  = Stokescher Radius des Ions

Für die elektrophoretische Mobilität gilt somit:

$$(2.2) \quad \mu_{ep} = \frac{z_i e_0}{6\pi\eta r_i}$$

Die direkte Berechnung der elektrophoretischen Mobilität ist aufgrund der molekül- und pufferspezifischen Größen nicht möglich, da Gleichung 2.2 nur für sphärische Teilchen in unendlich verdünnten Lösungen gilt. Ferner ist der Stokesche Radius nicht bekannt und auch nicht aus den meßbaren Ionenradien in Kristallgittern herzuleiten.



### 2.2.3.2 Elektroosmotischer Fluß

Ein wesentlicher elektrokinetischer Effekt bei kapillarelektrophoretischen Trennungen ist der elektroosmotische oder elektroendosmotische Fluß (EOF). Man versteht darunter die Bewegung einer Elektrolytlösung relativ zu einer geladenen Oberfläche, hervorgerufen durch ein elektrisches Feld. Die Elektroosmose basiert nach *Helmholtz* und *Stern* [111] auf einem Zwei-Phasen-System bestehend aus einer stationären Phase (Kapillarwand) und einer mobilen Phase (Elektrolyt), wobei sich durch das Anlegen eines elektrischen Feldes eine elektrische Doppelschicht ausbildet.

Unter wäßrigen Bedingungen tragen die meisten festen Oberflächen Ladungen. Dies entsteht entweder durch Ionisierung der Oberfläche oder durch Adsorption ionischer Spezies an der Oberfläche. Bei den am häufigsten verwendeten fused-silica-Kapillaren sind beide Phänomene zu beobachten, wobei der elektroosmotische Fluß überwiegend durch die mehr oder weniger stark dissoziierten Silanolgruppen der Kapillaroberfläche beeinflusst wird. Diese Silanolgruppen mit einem  $pK_s$ -Wert  $< 2$  [112] liegen in den allermeisten Fällen dissoziiert vor und bilden somit eine negativ geladene stationäre Oberfläche. Diese negativ geladene Oberfläche fixiert nun Kationen des Elektrolyten durch elektrostatische Wechselwirkungen an der Kapillarwand unter Ausbildung einer starren *Sternschicht*. Da sich diese Kationen aufgrund ihrer Hydrathülle nicht dicht genug an der Oberfläche der Kapillare anlagern können um alle negativen Ladungen zu kompensieren, werden weitere Gegenionen angelagert. Diese können jedoch nicht an der Oberfläche fixiert werden, so daß sich eine diffuse Grenzschicht, die sogenannte *Gouy-Chapman-Schicht* ausbildet (siehe Abbildung 15). Die Kationenkonzentration dieser diffusen Schicht nimmt exponentiell mit dem Abstand von der fused-silica-Oberfläche ab [112]. Mit zunehmendem Abstand der Kationen von der negativ geladenen Kapillaroberfläche verringert sich die Coulombsche Wechselwirkung und ermöglicht somit die Wanderung der diffusen Grenzschicht zur Kathode. Der Potentialverlauf in Abhängigkeit vom Abstand der Kationen von der Kapillarwand ist in Abbildung 16 dargestellt. Während in der starren *Sternschicht* das Potential linear von  $\Psi_0$  auf  $\Psi_\delta$  abnimmt, geht das Potential in der diffusen Grenzschicht von  $\Psi_\delta$  auf 0 exponentiell zurück. Die Elektroosmose hängt nun von dem Potential der sich bei der Wanderung der diffusen Grenzschicht ausbildenden Scherfläche zur starren Sternschicht ab. Dieses  $\zeta$ -Potential liegt zwischen  $\Psi_0$  und 0 und ist experimentell indirekt zugänglich.

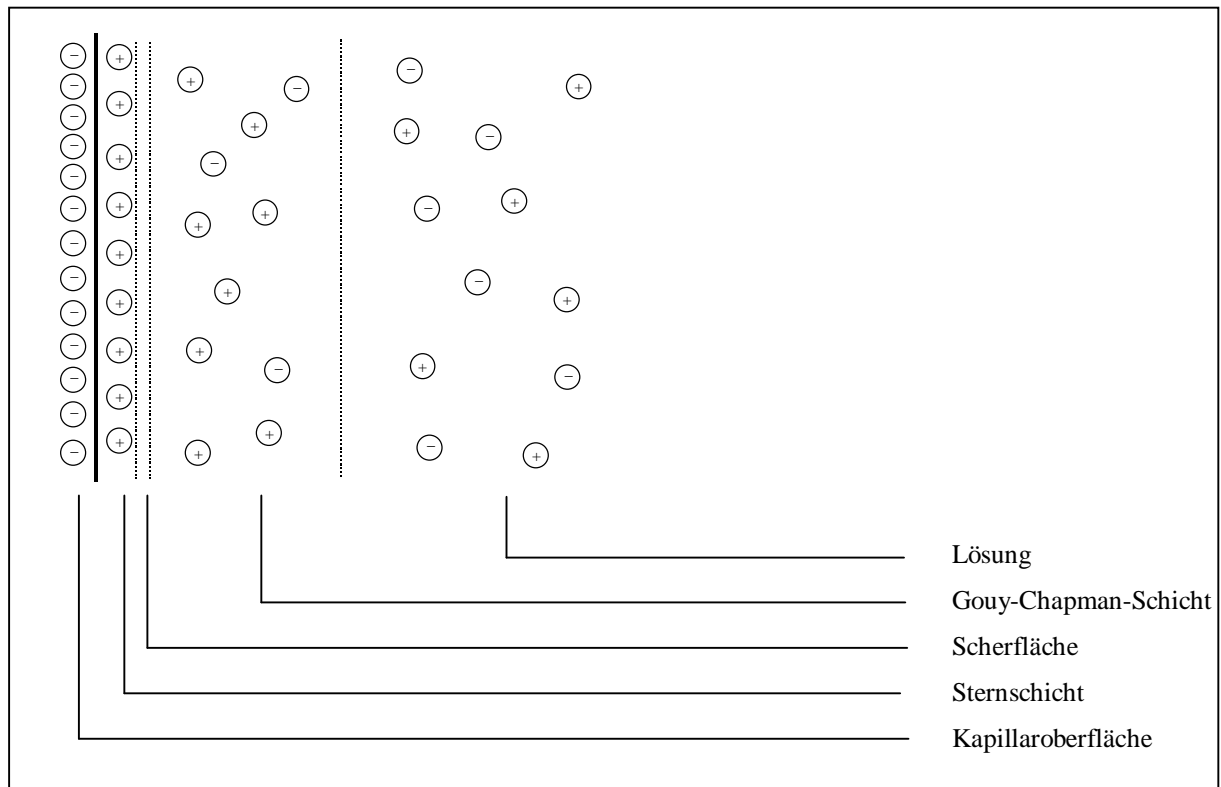


Abb. 15: Kationenverteilung an einer negativen Kapillarwand

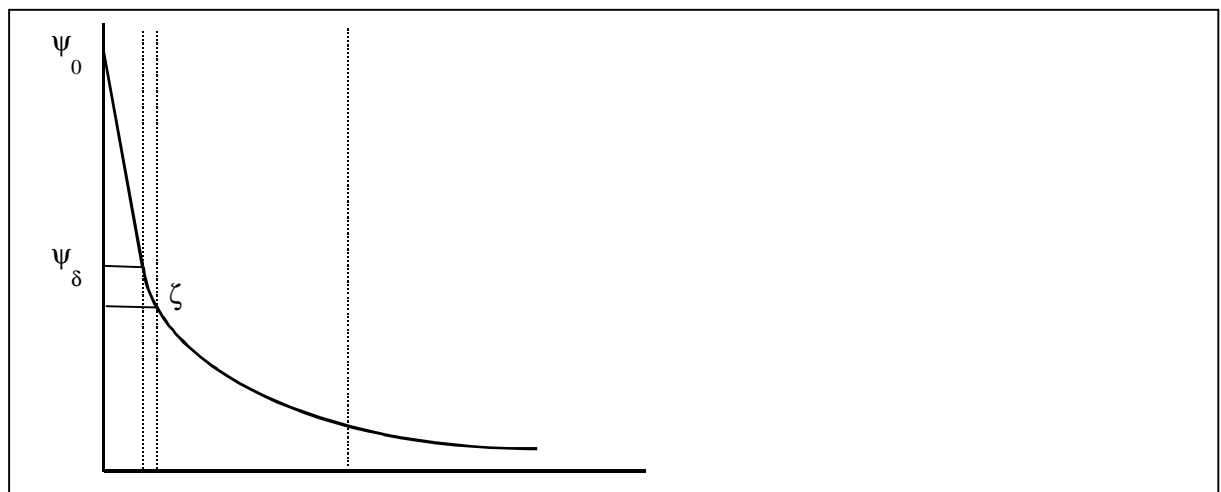


Abb. 16: Potentialverlauf in Abhängigkeit des Abstandes zur Kapillarwand

Legt man in einer mit Elektrolyt gefüllten Kapillare parallel zur geladenen Kapillaroberfläche ein elektrisches Feld an, so werden die beweglichen Kationen in der Gouy-Chapman-Schicht längs seiner Achse angezogen. In der Folge wird aufgrund der inneren Reibung die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mitbewegt. Somit ergibt sich im Falle von fused-silica-Kapillaren aufgrund der Anreicherung positiver Ionen in der Grenzschicht ein elektroosmotischer Fluß in Richtung Kathode.

Eine besondere Eigenschaft dieses elektroosmotischen Flusses ist die Ausbildung eines extrem flachen, stempelförmigen Profiles, welches eine sehr geringe Dispersion der Probenzonen und somit schmale Signale und folglich hohe Effizienzen zur Folge hat. Im Idealfall sollte bei kapillarelektrophoretischen Trennungen nur die Axialdiffusion zur Bandenverbreiterung beitragen, was mit dem *Einstein-Smoluchoskischen* Gesetz der Diffusion beschrieben werden kann [111]:

$$(2.3) \quad \sigma_D^2 = 2 \cdot D \cdot t_M$$

$D$  = Diffusionskoeffizient des Analyten;  $t_M$  = Migrationszeit  
 $\sigma_D^2$  = Bandenverbreiterung durch Diffusion

Die druckgetriebene Strömung in der Chromatographie bildet im Vergleich dazu ein parabolisches Hagen-Poiseuillesches-Strömungsprofil aus, welches zu einer deutlich stärkeren Dispersion der Probenzonen und somit zu breiteren Peaks führt (Abbildung 17).

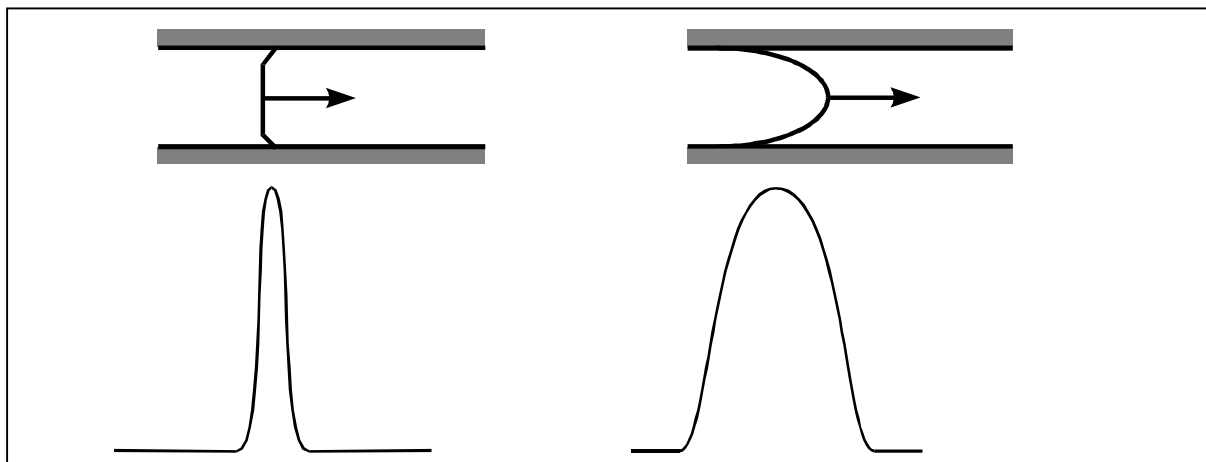


Abb. 17: Vergleich der Strömungsprofile und der entsprechenden Probenzonen bei CE und Chromatographie

Zur mathematischen Beschreibung des Zeta-Potentials und somit des elektroosmotischen Flusses geht man von dem Modell des Plattenkondensators aus. Dieser beschreibt Doppelschichten zwischen zwei sich relativ zueinander bewegenden Phasen [113].

$$(2.4) \quad \zeta = \frac{\omega}{P_{DH} \epsilon}$$

$\zeta$  = Zeta-Potential;  $\omega$  = Ladungsdichte an der Wandoberfläche;  
 $P_{DH}$  = Debye-Hückel-Parameter;  $\epsilon$  = Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten

Der Debye-Hückel-Parameter berechnet sich aus [114]:

$$(2.5) \quad P_{DH} = \sqrt{\frac{2000F^2}{\epsilon_0 \epsilon RT}} \sqrt{u}$$

$F$  = Faraday-Konstante;  $R$  = Gaskonstante;  $u$  = Ionenstärke;  $T$  = Temperatur  
 $\epsilon_0$  = Dielektrizitätskonstante des Vakuums

Die Ionenstärke  $u$  ist definiert als:

$$(2.6) \quad u = \frac{1}{2} \sum c_i z_i$$

$c_i$  = Konzentration aller Pufferbestandteile;  $z_i$  = Ladungszahl der Ionen

Aus den Gleichungen 2.4 bis 2.6 wird deutlich, daß das  $\zeta$ -Potential und damit der elektroosmotische Fluß umgekehrt proportional zur Ionenstärke und direkt proportional zur Ladungsdichte an der Kapillarwand ist. Somit bewirkt eine Konzentrationserhöhung des Puffers eine Verringerung des elektroosmotischen Flusses, während eine Steigerung des pH-Wertes aufgrund zunehmender Ionisation der Kapillarwand eine Erhöhung zur Folge hat.

Die Beeinflussung der Geschwindigkeit der Volumenströmung in der Kapillare durch die Feldstärke und dem  $\zeta$ -Potential beschreibt die *Smoluchowski*-Gleichung [111]:

$$(2.7) \quad v_{eof} = -\frac{\epsilon \zeta}{\eta} E$$

$v_{eof}$  = Geschwindigkeit der Volumenströmung (EOF)

Damit ergibt sich für die elektroosmotische Mobilität  $\mu_{eof}$ :

$$(2.8) \quad \mu_{eof} = -\frac{\epsilon \zeta}{\eta}$$

Ein kathodischer elektroosmotischer Fluß übt eine Kraft in Richtung Kathode auf die Analytmoleküle aus. Somit ergibt sich die effektive Mobilität  $\mu_{eff}$  eines Ions aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen Mobilität des Ions  $\mu_{ep}$  und der elektroosmotischen Mobilität  $\mu_{eof}$  im jeweiligen System:

$$(2.9) \quad \mu_{eff} = \mu_{eof} \pm \mu_{ep}$$

Dadurch ist es möglich, durch geeignete Wahl des elektroosmotischen Flusses Kationen, Anionen und ungeladene Moleküle zur Kathode zu bewegen. Dazu muß gewährleistet sein, daß  $\mu_{ep(\text{Anion})} < \mu_{eof}$  ist, so daß der elektroosmotische Fluß die in Richtung Anode gerichtete elektrophoretische Migration negativ geladener Ionen überkompensiert. Somit ergibt sich ein Elutionsprofil in der Reihenfolge Kationen vor ungeladenen Molekülen vor Anionen.

### 2.2.3.3 Joulesche Wärme

Der Hauptvorteil für die Verwendung von Kapillaren bei einer Elektrophorese liegt in dem günstigen Oberflächen-Volumen-Verhältnis und der damit verbundenen effektiven Wärmeabfuhr der entstehenden Jouleschen Wärme. Joulesche Wärme ist verantwortlich für die Bildung ungleichmäßiger Temperaturgradienten und lokalen Änderungen der Viskosität des Elektrolyten und führt somit zu starken Bandenverbreiterungen, die die Verwendung hoher elektrischer Felder in der klassischen Elektrophorese ausschließt.

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wird in der Kapillare ein Stromfluß erzeugt, der entscheidend vom Kapillardurchmesser und der speziellen Leitfähigkeit des Elektrolyten abhängig ist [115]. Für die elektrische Leistung ergibt sich somit:

$$(2.10) \quad P = UI = U^2 \kappa \frac{d^2 \pi}{4L_{ges}}$$

$P$  = Leistung;  $I$  = Stromstärke;  $U$  = Spannung;  $\kappa$  = Elektrolytleitfähigkeit;  
 $d$  = Kapillarinne Durchmesser;  $L_{ges}$  = Gesamtlänge der Kapillare

Gleichung 2.10 verdeutlicht die quadratische Abhängigkeit der elektrischen Leistung von der angelegten Trennungsspannung und dem Kapillardurchmesser. Durch die teilweise Umwandlung der elektrischen Leistung in Joulesche Wärme muß bei einer Verdoppelung des Kapillarinne Durchmessers die Trennungsspannung geviertelt werden, soll die elektrische Leistung und damit die Joulesche Wärme konstant bleiben. Diese Reduzierung der Trennungsspannung hat aber eine Verlängerung der Analysenzeiten und somit eine Bandenverbreiterung durch Diffusion zur Folge.

Die Abfuhrung der Jouleschen Wärme erfolgt ausschließlich über die Kapillarwand. Es kommt zur Ausbildung eines radialen, parabolischen Temperaturgradienten im Puffer. Dadurch werden Bereiche höherer Pufferviskosität an den Kapillarwänden erzeugt, wodurch die Analyten in diesen Bereichen langsamer wandern als in der wärmeren Kapillarmitte, wo die Pufferviskosität und somit der Reibungswiderstand geringer ist [116] (siehe Abbildung 18).

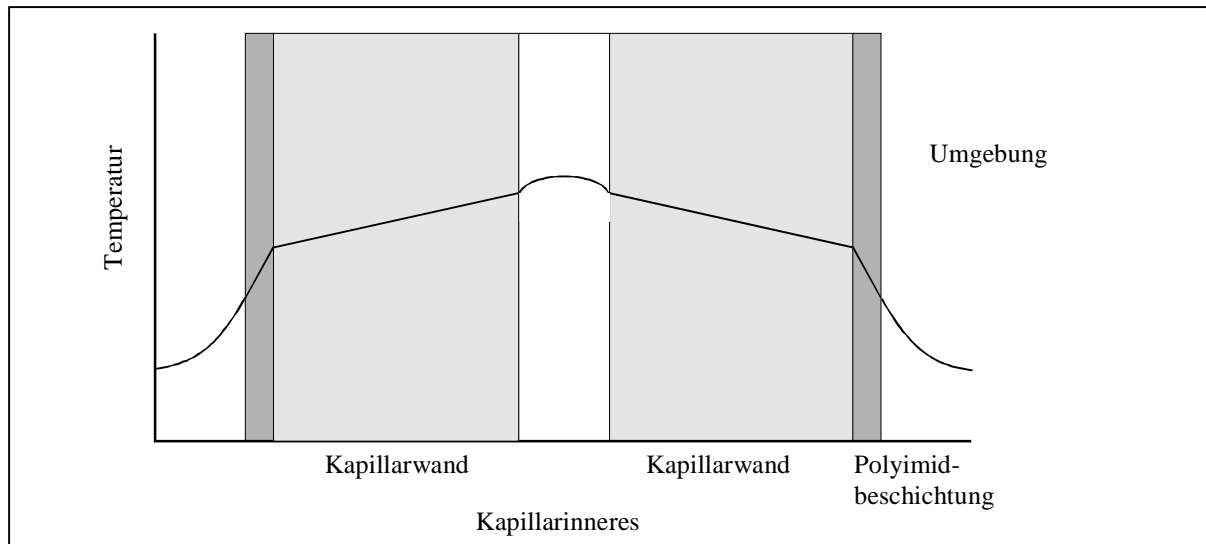


Abb 18: Schematische Darstellung des Temperaturgradienten in einer Kapillare

## 2.2.4 Detektoren

Die Detektion stellt bei der Kapillarelektrophorese aufgrund des geringen Innendurchmessers der Kapillare hohe Anforderungen. Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Arten der Detektion:

### *a) on-column-Detektion*

Hierbei erfolgt die Detektion direkt in der Kapillare. Eingesetzt werden üblicherweise UV- oder Fluoreszenzdetektoren. Wegen den oben angesprochenen Kapillardimensionen und der daraus resultierenden geringen Schichtdicke (Innendurchmesser von 25 bis 75  $\mu\text{m}$ ) müssen die Detektoren hohen Ansprüchen bezüglich Empfindlichkeit, Rauschen, Streulichteinfluß u.ä. genügen. Bei der Fluoreszenzdetektion werden neben den gebräuchlichen Deuterium- und Xenon-Blitzlampen auch Laser als Lichtquelle eingesetzt.

### *b) post-column-Detektion*

Bei diesen Detektoren werden die Probenkomponenten erst am Kapillarende detektiert. Käuflich zu erwerbende Detektoren sind Leitfähigkeitsdetektoren und massenselektive Detektoren wie z. B. ESI-Massenspektrometrie. In der Literatur werden aber auch weitere Arten beschrieben wie zum Beispiel Detektion via MALDI-TOF [117] oder Autoradiographie radioaktivmarkierter Analyten nach erfolgtem Blotting am Kapillarende [103].

### 2.2.5 Probenaufgabe

Hohe Anforderungen werden an das Probenaufgabesystem einer kapillarelektrophoretischen Apparatur gestellt, da die injizierten Volumina nur wenige Nanoliter betragen. Um die hohen Effizienzen zu gewährleisten, muß eine Überladung der Kapillare vermieden werden. Der kritische Faktor dabei ist die Größe des Probenpfropfens, der etwa 1% der Kapillarlänge betragen sollte. Dies bedeutet eine zur Verfügung stehende Injektionslänge von wenigen Millimetern. Unter Berücksichtigung des Kapillardurchmessers ergeben sich typischerweise Injektionsvolumina von 1 bis 50nl. Dies ist vorteilhaft, wenn nur geringe Probenmengen zur Verfügung stehen, limitiert aber gleichzeitig die Sensitivität für verdünnte Lösungen.

Es kann entweder die hydrodynamische oder elektrokinetische Injektion eingesetzt werden. In beiden Fällen ist das Injektionsvolumen mathematisch zugänglich. Die quantifizierbaren Parameter sind entweder Druck und Zeit für die hydrodynamische oder Spannung und Zeit für die elektrokinetische Injektion.

#### a) Hydrodynamische Injektion

Die hydrodynamische Injektion kann entweder durch Anlegen eines Druckes am Inlet, eines Vakuums am Outlet oder eines hydrostatischen Druckes erfolgen. Die aufgegebene Probenmenge berechnet sich nach dem Poiseuilleschen Gesetz für laminare Flüsse in einem Rohr [118]:

$$(2.11) \quad V_i = \frac{\Delta p \pi r^4 t_{inj}}{8 \eta L_{ges}}$$

$V_i$  = Injektionsvolumen;  $\Delta p$  = Druckdifferenz;  $r$  = Innenradius der Kapillare;  $t_{inj}$  = Injektionszeit;  
 $L_{ges}$  = Gesamtlänge der Kapillare;  $\eta$  = Viskosität

Der schnelle Anstieg und Abfall des Druckes über dem Probengefäß führt zu Druckspitzen, die eine exakte Reproduzierbarkeit der Injektionsvolumina ausschließen. Aus diesem Grund verwendet man in der Praxis ein Produkt aus Druck und Injektionszeit, welches reproduzierbarere Injektionsvolumina gewährleisten soll.

#### b) Elektrokinetische Injektion

Bei der elektrokinetischen Injektion nutzt man die Tatsache aus, daß das elektrische Feld in der Kapillare eine elektrophoretische und elektroosmotische Bewegung erzeugt. Wenn das Inlet in ein Probengefäß eintaucht und eine Spannung angelegt wird, migrieren die geladenen

Probenkomponenten in die Kapillare. Die Konzentrationen der injizierten Probenbestandteile  $i$  berechnet sich nach [118]:

$$(2.12) \quad Q_i = \frac{(\mu_i + \mu_{eof}) \pi r^2 U c_i t_{inj}}{L_{ges}}$$

$Q_i$  = Konzentration der injizierten Spezies  $i$ ;  $c_i$  = Konzentration der Spezies  $i$  im Probengefäß;  
 $\mu_i$  = elektrophoretische Mobilität der Spezies  $i$

Die Konzentration der injizierten Komponenten kann durch die angelegte Spannung oder die Injektionszeit variiert werden. Sie sind vom elektroosmotischen Fluß in der Kapillare und von ihrer eigenen elektrophoretischen Mobilität abhängig. Somit kommt es zu einer Diskriminierung der aufgrund einer geringeren elektrophoretischen Mobilität langsamer wandernden Komponente. Deshalb spiegelt die injizierte Menge nicht die Ausgangskonzentrationen im Probengefäß wieder. Darüber hinaus sinkt die Konzentration an Komponenten hoher Mobilität im Probengefäß und führt zu einer veränderten Zusammensetzung der Probe, was bei Mehrfachmessungen berücksichtigt werden muß. Diesen Nachteilen der elektrokinetischen Injektion steht die Probenanreicherung im Probenpfropfen gegenüber. Verwendet man gelgefüllte Kapillaren, stellt die elektrokinetische Injektion allerdings die einzig mögliche Probenaufgabe dar.

## 2.2.6 Puffersysteme

Für alle kapillarelektrophoretischen Methoden gilt, daß die Wahl des als Elektrolyt verwendeten Puffersystems den größten Einfluß auf die Trennleistung hat und sehr sorgfältig vorgenommen werden sollte. Folgende Anforderungen muß ein Puffersystem erfüllen [115]:

- Selektivität für die zu trennenden Ionen
- ausreichende Pufferkapazität im gewünschten pH-Bereich
- Stabilität des Puffers
- geringe Mobilität des Gegenions
- entsprechende Mobilität der Puffer- und Analytionen

### 2.2.6.1 pH-Wert

Der Einfluß des pH-Wertes auf den Transport der Analyten zum Detektor hat im wesentlichen zwei Ursachen. Einerseits bestimmt er zum Teil die elektrophoretische Mobilität der



Analytkomponenten durch die Beeinflussung ihres Dissoziationsgrades. Darüber hinaus ist, wie unter Abschnitt 2.2.3.2 aufgeführt, die elektrophoretische Migration durch den elektroosmotischen Fluß überlagert. Die Größe des elektroosmotischen Flusses in fused-silica-Kapillaren wird durch die unterschiedlich starke Dissoziation der Silanolgruppen der Kapillarwand bestimmt und hängt somit ebenfalls von dem pH-Wert des eingesetzten Puffers ab. Durch Variation des pH-Wertes und der Art des Puffers kann deshalb die Trennung optimiert werden. Zu beachten ist dabei allerdings, daß bei pH-Werten unter 2 und über 12 der Stromtransport überwiegend durch Protonen bzw. Hydroxidionen erfolgt, was aufgrund der hohen Mobilität dieser Teilchen zu großen Stromstärken und somit zu hoher Joulescher Wärme führt. Dies wirkt sich nachteilig auf die Trenneffizienz aus.

#### **2.2.6.2 Pufferadditive**

Puffer werden aus unterschiedlichen Gründen mit Additiven versetzt. So kann die Erhöhung der Löslichkeit für hydrophobe Proben oder die Erhöhung der Selektivität zu einer Verbesserung der Trennung führen. Weiterhin hat man die Möglichkeit, Wandadsorption und den elektroosmotischen Fluß zu modifizieren.

##### *a) Organische Lösungsmittel*

Die Löslichkeit hydrophober Proben kann deutlich durch Zugabe wasserlöslicher organischer Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril erhöht werden. Durch den organischen Lösungsmittelanteil verändert sich außerdem die Viskosität und die Selektivität des Puffers. Zudem wird das  $\zeta$ -Potential der Kapillarwand und somit der elektroosmotische Fluß verändert. Zu beachten ist dabei allerdings, daß die organischen Lösungsmittel in der Regel deutlich niedrigere Siedetemperaturen haben und somit die Gefahr der Blasenbildung bei zu großer Joulescher Wärme besteht, wodurch die angelegte Spannung zusammenbricht. Somit ist eine effektive Kapillarenkühlung zur Vermeidung des Verdampfens der organischen Anteile bei höheren Trennspannungen erforderlich.

##### *b) Tenside*

Eine nicht ausreichende Inertheit der Kapillarwand gegenüber Probenbestandteilen kann zu unerwünschter Adsorption der Komponenten führen. Dabei sind Verbreiterungen der Analytzone zu beobachten, die zu schlechteren Effizienzen führen [112,115,118]. Um dies zu vermeiden kann der Elektrolyt mit kationischen oder neutralen Tensiden versetzt werden.

Durch dynamische Belegung der Kapillarwand wird die unerwünschte Wandadsorption unterdrückt und der elektroosmotische Fluß wie in Abbildung 19 reproduzierbar verändert.

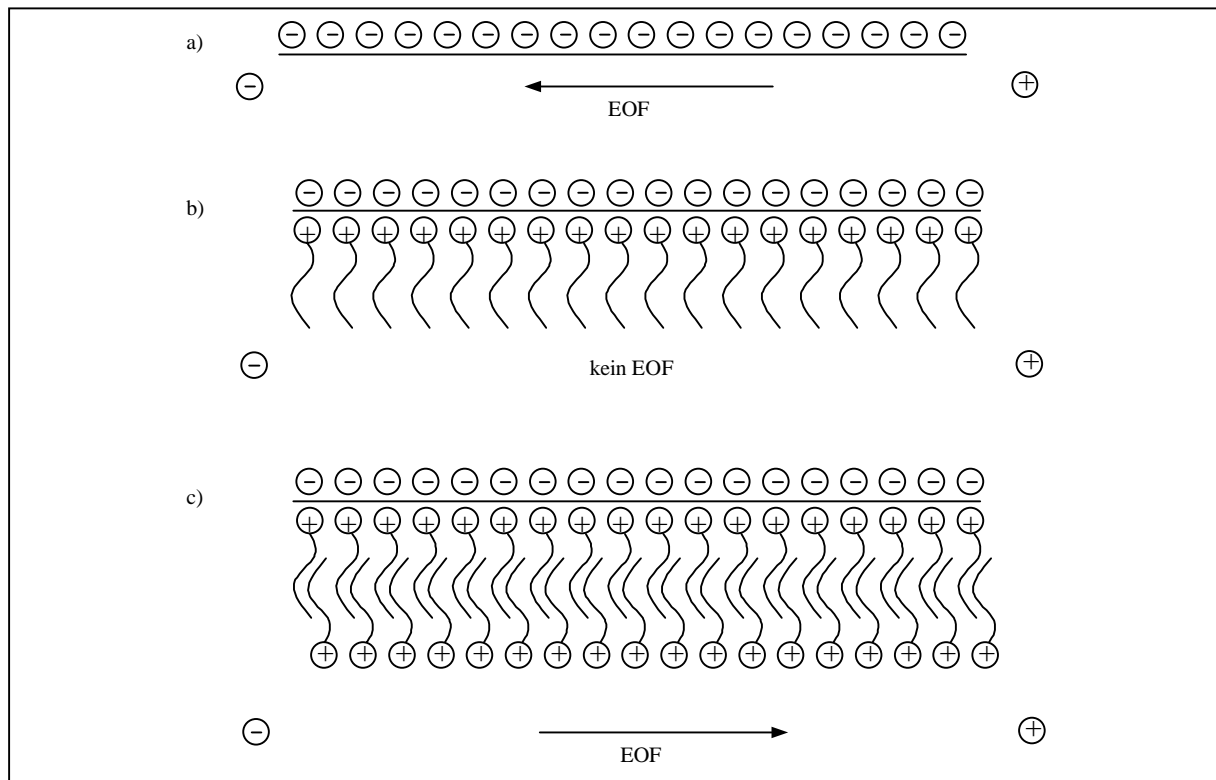


Abb. 19: Adsorption von kationischen Tensiden an der Kapillarwand und Konsequenzen für den elektroosmotischen Fluß

Der zur Kathode gerichtete elektroosmotische Fluß (Abb. 19a) kann durch eine einfache Belegung der Kapillarwand (Abb. 19b) verringert bzw. unterdrückt werden. Höhere Tensidkonzentrationen führen zu einer Umkehrung des elektroosmotischen Flusses (Abb. 19c). Die Konzentration des Tensids sollte aber unterhalb der kritischen micellaren Konzentration liegen, um unerwünschte Aggregationen der Tenside zu vermeiden. Die erhöhte Konzentration geladener Tensidmoleküle führt wegen den Gegenionen wie zum Beispiel  $\text{Na}^+$  zu einer Erhöhung der Pufferleitfähigkeit und somit zu größerer Joulescher Wärme. Zu ihrer Reduzierung sollte die Feldstärke oder der Kapillardurchmesser begrenzt werden.

### c) Chirale Selektoren

Zur Trennung von Enantiomeren werden chirale Selektoren wie Cyclodextrine als Pufferadditive verwendet. Die sich bildenden Diastereomerenpaare aus chiraalem Analyt und Additiv haben unterschiedliche Bildungs- und Zerfallskonstanten, die letztendlich für die Trennung verantwortlich sind. Der große Vorteil der Kapillarelektrophorese für chirale

Trennungen liegt darin, daß unterschiedlich optisch aktive Umgebungen innerhalb kürzester Zeit durch Additive erzeugt und auf ihre Selektivität getestet werden können. Gas- oder Flüssigkeitschromatographische Methoden sind auf eine bedeutend aufwendigere und teurere Immobilisierung der optisch aktiven Substanzen angewiesen.

### 2.2.7 Kapillarelektrophoretische Methoden

Das einfache Prinzip kapillarelektrophoretischer Trennungen eröffnet eine große Anzahl unterschiedlicher Applikationen. Die wichtigsten Ausführungstechniken sind die Kapillarzonenlektrophorese, die Kapillargelelektrophorese und die elektrokinetische Chromatographie.

#### 2.2.7.1 Kapillarzonenlektrophorese

Bei der Kapillarzonenlektrophorese (CZE) findet die Trennung in einer lediglich mit Puffer gefüllten Kapillare statt (Abbildung 20). Nach der Probenaufgabe wird eine Spannung zwischen Inlet und Outlet angelegt und unter dem Einfluß des elektrischen Feldes migrieren die Probenkomponenten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten zu den entsprechenden Elektroden. Da in fused-silica-Kapillaren der elektroosmotische Fluß zur Kathode gerichtet ist und in den meisten Fällen die Elektromigration der Anionen überkompensiert, können sowohl Kationen, Anionen und neutrale Teilchen am kathodischen Ende der Kapillare detektiert werden.

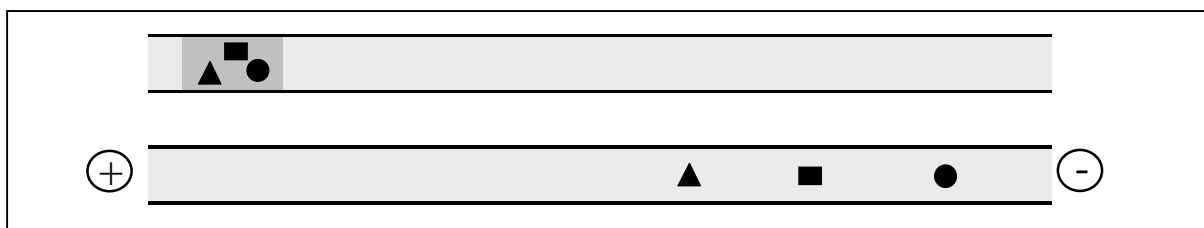


Abb. 20: Schematische Darstellung einer CZE-Trennung

#### 2.2.7.2 Elektrokinetische Chromatographie

Die micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) stellt eine Kombination aus elektrophoretischen und micellaren flüssigkeitschromatographischen Trennprinzipien dar. Diese Technik wurde von *Terabe et al.* zur Trennung ungeladener Probenkomponenten eingeführt [119,120]. Sie beruht auf dem Verteilungsgleichgewicht zwischen einer mobilen,

durch Elektroosmose bewegten Phase und einer „pseudo-stationären“ Phase, gebildet durch Micellen. Als Micellenbildner werden Tenside oberhalb ihrer kritischen micellaren Konzentration eingesetzt. Die dabei verwendeten Detergentien können sowohl anionisch (Natriumdodecylsulfat, SDS), kationisch (Hexadecyl-trimethylammoniumchlorid, CTAB) oder zwitterionisch (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxypropansulfonat, CHAPS) sein. Daneben gibt es ungeladene Pufferadditive wie chirale Cyclodextrine zur Trennung von Enantiomergemischen (Abschnitt 2.2) oder Kronenethern, die als Wirtsmoleküle dienen.

Die Micellenbildung tritt als direkte Konsequenz des Hydrophobieeffektes auf, wenn die für jedes Detergenz spezifische kritische micellare Konzentration überschritten wird. Dann richten sich die hydrophoben Schwänze zum Zentrum der Aggregate, während die hydrophilen, meist geladenen Köpfe nach außen orientiert sind. Der Durchmesser der Micellen beträgt 3 bis 6nm, womit eine homogene Lösung gewährleistet ist. Ein Charakteristikum einer Micelle ist die Aggregationszahl, d. h. die Zahl der Tensidmoleküle, die eine Micelle ausbilden.

Detergenzien		kritische micellare Konzentration [mM]	Aggregationszahl
anionisch	SDS	8,2	64
kationisch	CTAB	1,3	78
ungeladen	Oktylglucosid	-	-
	n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid	0,16	-
zwitterionisch	Triton X-100	0,24	140
	CHAPS	8	10
	CHAPSO	8	11
Cholate	Cholsäure	14	2-4
	Deoxycholsäure	5	4-10
	Taurocholsäure	10-15	4

Tab. 2: Übersicht der gebräuchlichsten Micellenbildner und deren Charakteristika [120,121]

Die äußere, geladene Sphäre der Micellen erzeugt im elektrischen Feld eine elektrophoretische Mobilität. In Abhängigkeit zum Vorzeichen der Ladungen ist die elektrophoretische Mobilität der Micelle in Richtung Anode oder Kathode gerichtet. In Abbildung 21 wird ein anionisches Tensid wie zum Beispiel Natriumdodecylsulfat als Micellenbildner verwendet [115,118].

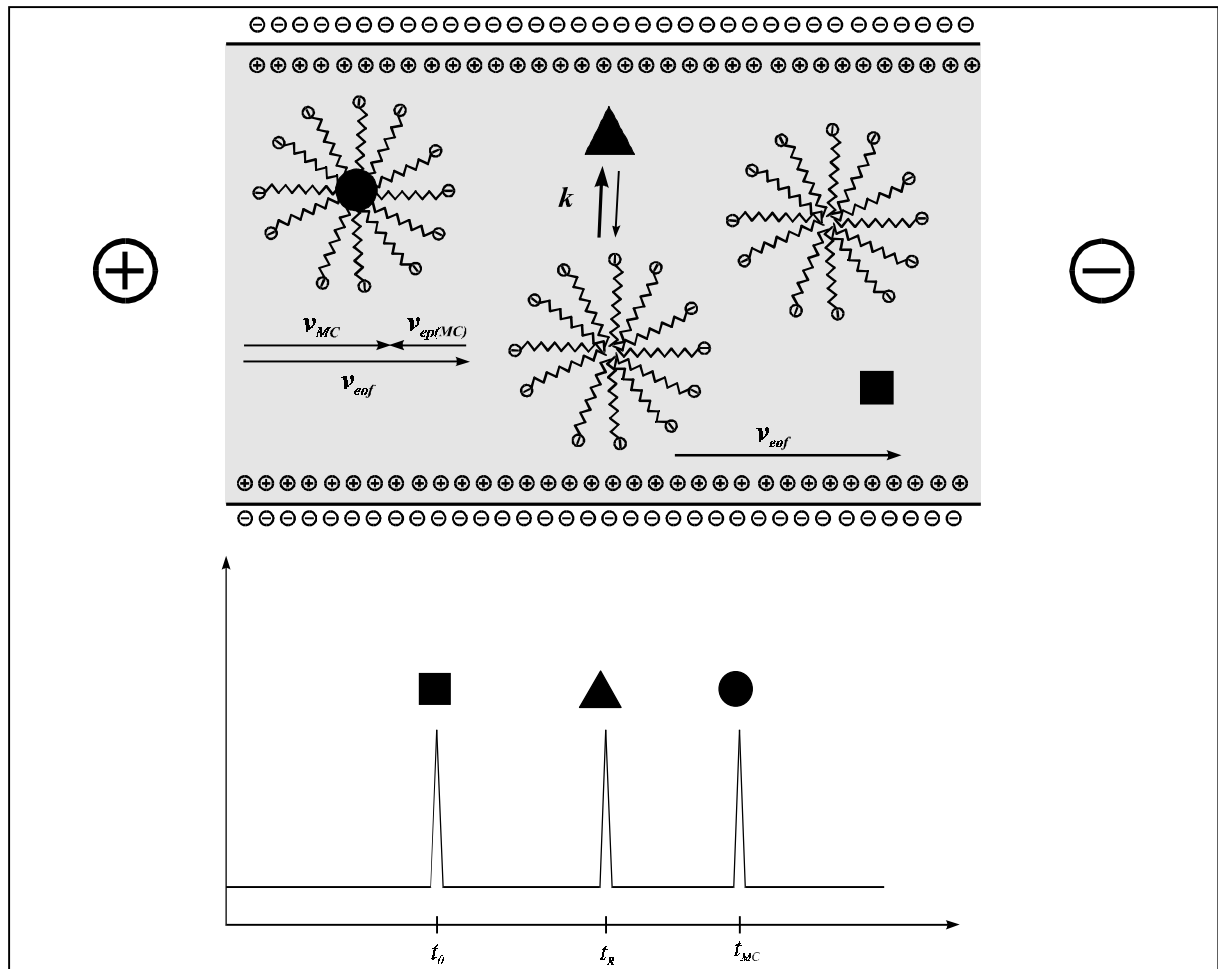


Abb. 21: Micellare elektrokinetische Chromatographie;  $v_{eof}$  = Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses;  $v_{ep(MC)}$  = elektrophoretische Mobilität der Micelle;  $v_{MC}$  = Nettogeschwindigkeit der Micelle;  $k$  = Verteilungskonstante einer Probenkomponente zwischen Micelle und Elektrolyt;  $t_0$  = Totzeit (Retentionszeit nicht mit der Micelle wechselwirkender Probenkomponente;  $t_R$  = Retentionszeit wechselwirkender Probenkomponente;  $t_{MC}$  = Retentionszeit ausschließlich sich in der Micelle befindender Probenkomponente

Da die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit  $v_{ep(MC)}$  der Micellen zur Anode gerichtet ist und durch den zur Kathode gerichteten elektroosmotischen Fluß der Geschwindigkeit  $v_{eof}$  überlagert ist, ergibt sich die Netto-Micellengeschwindigkeit  $v_{MC}$  in Richtung der Kathode. Polare, ungeladene Moleküle, die sich ausschließlich in der wäßrigen Phase aufhalten und keine Wechselwirkung mit den Micellen zeigen, wandern mit der Geschwindigkeit des EOF und erreichen mit der Totzeit  $t_0$  den Detektor. Hydrophobe Probenkomponenten, die sich ausschließlich in der Micelle befinden, wandern mit der Geschwindigkeit  $v_{MC}$  durch die Kapillare und erreichen den Detektor in der Zeit  $t_{MC}$ . Diese beiden Grenzfälle - keine Wechselwirkung mit der Micelle und ausschließliches Aufhalten in der Micelle - und die daraus resultierende zeitliche Differenz zwischen  $t_0$  und  $t_{MC}$  wird als *micellares Fenster* bezeichnet. Je größer dieses Fenster ist, desto höher ist die Selektivität.

Probenkomponenten, die mit der Micelle mit der Gleichgewichtskonstante  $k$  wechselwirken, eluieren innerhalb dieses micellaren Fensters.

### 2.2.7.3 Kapillargelelektrophorese

Bei der Kapillargelelektrophorese (CGE) erfolgt die Trennung aufgrund deutlicher Größenunterschiede der Probenkomponenten (Abbildung 22). Insbesondere biologische Makromoleküle, die als Polyanionen oder Polykationen vorliegen, unterscheiden sich nur gering in ihren Ladungsdichten und somit in ihrer elektrophoretischen Mobilität. Ist aber die Kapillare mit einer Polymerlösung gefüllt, die ein dreidimensionales Netzwerk darstellt, wird die Mobilität der Probenkomponenten größenabhängig beeinflusst. Somit beruht der Transport durch die Kapillare auf der Ladung der Makromoleküle, die Migrationszeit hängt jedoch von der Molekülgröße ab. Viele in der CGE verwendeten „Gele“ besitzen keine feste Struktur und sind besser durch den Begriff „polymeres Netzwerk“ oder „sieving buffer“ beschrieben. Die verwendeten Polymere in der CGE können kovalent miteinander verknüpft (bis-Polyacrylamid) oder durch Wasserstoffbrücken verbunden (Agarose) sein oder als Netzwerk linearer Polymerlösungen (Polyacrylamid oder Methylcellulose) vorliegen.

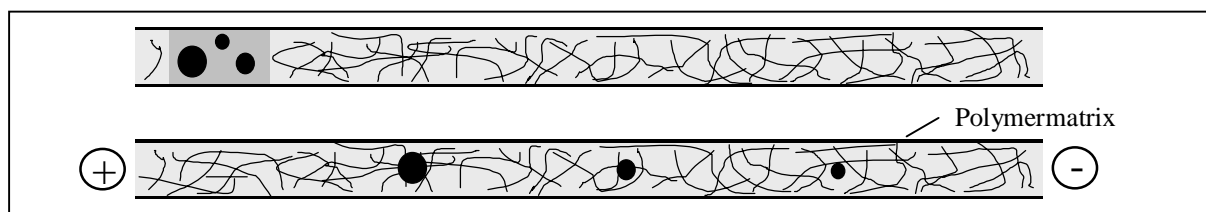


Abb. 22: Größenselektive Trennung in der CGE

## 2.3 Theoretischer Hintergrund - Fluoreszenzmarkierung

Radioaktive Markierungen ermöglichen den Nachweis sehr geringer Substanzmengen. Allerdings ist der Einsatz radioaktiver Isotope mit erheblichen Nachteilen behaftet. Die Vorkehrungen zur Vermeidung gesundheitlicher Folgen, die Entsorgungskosten sowie die erforderlichen behördlichen Umgangsgenehmigungen führen zur zunehmenden Verdrängung dieser Methodik durch Fluorophore und Luminophore [122]. Die dabei eingesetzten Fluoreszenzmarker bestehen aus zwei getrennt zu betrachtenden Molekülteilen, nämlich dem eigentlichen Fluorophor als signalgebendem Baustein und der Ankergruppe, welche als reaktive Kopplungseinheit die Anbindung an das zu markierende Molekül ermöglicht. Zur Vermeidung unerwünschter Wechselwirkungen zwischen markierter Substanz und

signalgebendem Baustein befindet sich meist ein Abstandhalter (Spacer) zwischen Ankergruppe und Fluorophor. Voraussetzung für den Einsatz einer lumineszenten Verbindung als Fluoreszenzmarker ist eine ausreichende Fluoreszenzquantenausbeute und Stabilität unter den gewünschten Anwendungsbedingungen. Darüber hinaus ist die synthetische Funktionalisierbarkeit zur Variation der spektroskopischen und chemischen Eigenschaften von entscheidender Bedeutung. Die Anwendungsbreite der heute zur Verfügung stehenden Fluoreszenzmarker ist mittlerweile kaum noch zu überschauen. Unterschiedliche Fluorophore mit unzähligen Substituenten zur Anpassung ihrer spektralen Eigenschaften werden mit immer neueren Ankergruppen kombiniert, so daß sich immer mehr Anwendungsgebiete eröffnen.

### 2.3.1 Charakteristika moderner Fluoreszenzmarker

#### 2.3.1.1 Fluorophor

Moderne Fluoreszenzmarker stehen heute in großer Auswahl zur Verfügung. Als Fluorophore werden heutzutage zumeist Xanthenfarbstoffe wie Fluorescein und Rhodamine [123] oder Indacen-Derivate wie zum Beispiel BODIPY [124] der Firma Molecular Probes (Eugene, OR, USA) [123] eingesetzt (Abbildung 23).

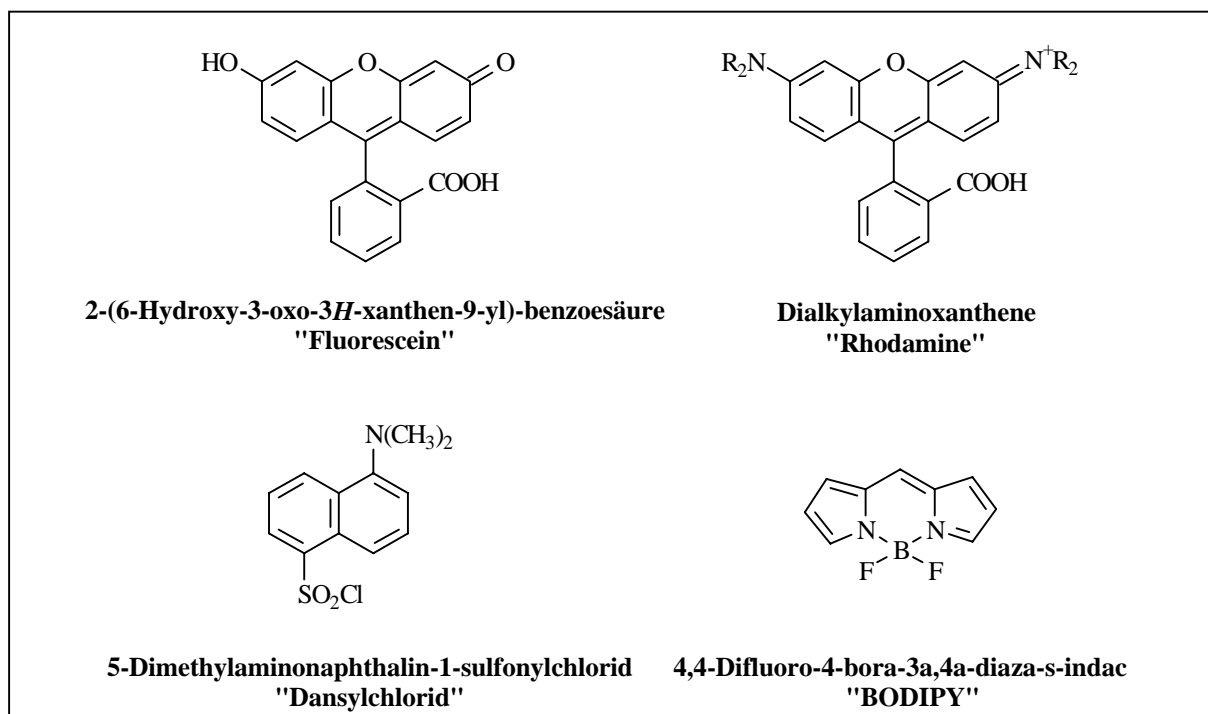


Abb. 23: Grundgerüste wichtiger Fluoreszenzfarbstoffe

Durch chemische Derivatisierung der verschiedenen fluorophoren Grundgerüste sind die spektroskopischen Eigenschaften dieser Marker in weiten Bereichen variierbar, so daß für jeden gewünschten Wellenlängenbereich ein geeigneter Farbstoff zur Verfügung steht. Unter den dargestellten Fluorophoren nimmt BODIPY wegen seiner besonderen Eigenschaften eine Sonderstellung ein. Einige Charakteristika lassen dieses Grundgerüst gegenüber dem am weitesten verbreiteten Farbstoff Fluorescein überlegen erscheinen. So sind die Fluoreszenzeigenschaften unabhängig vom pH-Wert des Lösungsmittels [123] und die schmalen Emissionsbanden bedingen eine höhere Signalintensität als bei den meisten anderen Fluorophoren [123].

### 2.3.1.2 Ankergruppe

Ein wichtiges Kriterium für die Wahl des Markers ist die gewünschte Markierungsart des zu detektierenden Materials. Auch hier gibt es mittlerweile eine Fülle von Möglichkeiten je nach Problemstellung. Zum Beispiel wird zum Nachweis und zur Quantifizierung genomischer oder PCR-amplifizierter DNA Ethidiumbromid eingesetzt. Dieser interkalierende Marker bindet in einem stöchiometrischen Verhältnis von einem Molekül pro 4 bis 5 Basenpaare an doppelsträngige DNA [123]. Enzymatische Prozesse wiederum lassen sich durch fluorogene Enzymsubstrate verfolgen. So kann man die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität durch die Freisetzung von Fluorescein aus dem Substrat Fluorescein-di- $\beta$ -D-galactopyranosid untersuchen [123]. Phosphatsubstituierte Fluoreszenzmarker ermöglichen die Detektion Phosphat-metabolisierender Enzyme wie zum Beispiel der alkalischen Phosphatase [125]. Sehr häufig werden Fluorophore kovalent an die zu detektierenden Biomoleküle gebunden. Zu diesem Zweck wurde eine Vielzahl von Ankergruppen in Abhängigkeit zu den zur Kopplung geeigneten funktionellen Gruppen des Biomoleküls entwickelt.

#### *a) Amin-reaktive Ankergruppen*

Fluorophore mit Amin-reaktiven Ankergruppen dienen zur Markierung von Proteinen, Peptiden und Antikörpern für *in situ*-Hybridisierung oder Rezeptorlabeling [126]. In diesen Fällen ist die chemische Stabilität der Kopplung von besonderer Bedeutung, da die markierten Biomoleküle relativ drastischen Bedingungen wie wiederholtem Hybridisieren und Waschen ausgesetzt sind. In aller Regel bilden die reaktiven Ankergruppen mit Aminen Säureamide, Sulfonamide, Harnstoff- oder Thioharnstoffderivate. Bei Proteinen werden zum Beispiel die  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins zur Markierung herangezogen [123]. Um eine ausreichende



Reaktionskinetik zu gewährleisten, muß der  $pK_s$ -Wert der anzugreifenden funktionellen Gruppen bedacht werden. Aliphatische Amine wie Lysin liegen erst ab einem pH-Wert oberhalb von 8 in nennenswertem Maße unprotoniert, also für die Kopplung geeignet vor [123]. Somit sind pH-Werte zwischen 8,5 und 9,5 für diese Kopplungen optimal. Die wohl am weitesten verbreitete Ankergruppe ist die Isothiocyanat-Gruppe. Im Vergleich zum Isocyanat hat sie den Vorteil, in Wasser ausreichend stabil zu sein. Darüber hinaus ist der gebildete Thioharnstoff unter den meisten Bedingungen stabiler. Aufgrund der hohen Stabilität der mit Aminen gebildeten Carboxamid-Funktion werden sehr gerne auch Succinimidester als Ankergruppe eingesetzt. Diese Peptid-analoge Bindung hydrolysiert erst oberhalb eines pH-Wertes von 9 nennenswert und gewährleistet getrocknet lange Haltbarkeit [123]. Allerdings ist die Succinimidestergruppe nicht sehr gut wasserlöslich. In der Praxis verwendet man deshalb Sulfosuccinimidester [123]. Sulfonsäurechloride bilden mit Aminen ebenfalls extrem stabile Sulfonamide, die sogar komplette Proteinhydrolyse überstehen. Allerdings macht die starke Hydrolyseempfindlichkeit dieser Ankergruppe (innerhalb von 2 bis 3 Minuten tritt unter Raumtemperatur bei pH = 8 komplette Hydrolyse ein) nur einen Einsatz bei tiefen Temperaturen sinnvoll [123]. Aldehyde zur quantitativen Bestimmung von Aminen in Lösung via HPLC und Kapillarelektrophorese wurden von *Novotny et al.* eingesetzt [127,128]. Abbildung 24 gibt einen Überblick über die gebräuchlichsten Amin-reaktiven Ankergruppen.

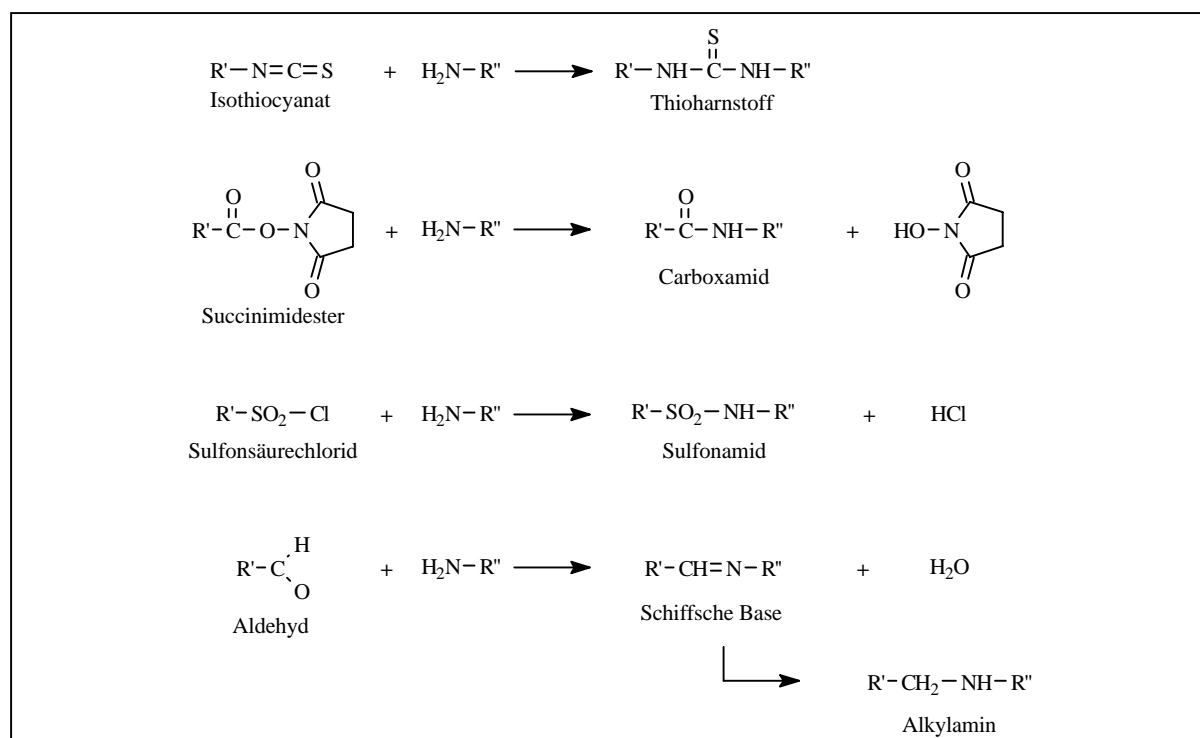


Abb. 24: Reaktionen primärer Amine mit den gebräuchlichsten Ankergruppen

### b) Alkohol-reaktive Ankergruppen

Alkoholgruppen kommen in fast allen Biomolekülen vor. Dennoch stellt ihre gezielte Modifikation unter wässrigen Bedingungen ein kaum zu lösendes Problem dar. Zu gering ist ihre chemische Reaktivität im Vergleich zu den konkurrierenden Amin- und Thiolgruppen. In organischen Solventien jedoch ist es durchaus möglich, Alkohole hochsensitiv durch Fluoreszenzmarkierung nachzuweisen [123]. Dazu geht man von Acylaziden aus, welche in einem organischen Lösungsmittel wie Toluol oder Dioxan zusammen mit dem Alkohol erhitzt werden. Durch Curtius-Umlagerung bildet sich *in situ* durch Erwärmen ein Isocyanat, welches mit dem Alkohol zu einem stabilen Urethan reagiert (Abbildung 26).

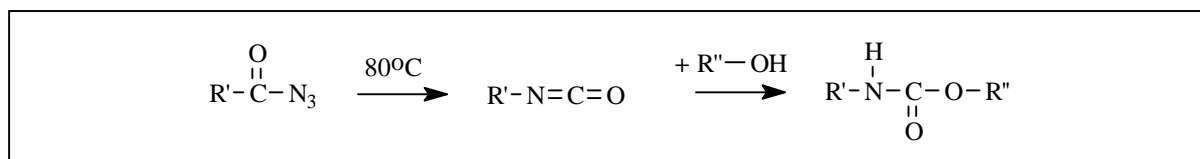


Abb. 26: Derivatisierung eines Alkohols mit einem Acylazid

Eine Alternative stellt die Verwendung von Fluoreszenzmarkern dar, die über eine Phosphoramiditgruppe verfügen. Diese Technologie wird beim Markieren von Oligonukleotiden in der automatisierten Oligonukleotidsynthese angewendet [129,130]. Dabei koppelt man unter Feuchtigkeitsausschluss in Acetonitril das Fluorophosphoramidit durch Aktivierung mittels Tetrazol an die entschützte 5'-OH-Gruppe des festphasengebundenen Oligonukleotids. Anschließend wird das intermediär gebildete Phosphit durch Cumolhydroperoxid oder Iodid zum Phosphat oxidiert. Abschließend wird das gelabelte Oligonukleotid ammoniakalisch entschützt und von der Festphase abgespalten. Abbildung 27 zeigt schematisch den Ablauf einer solchen Markierungsreaktion.

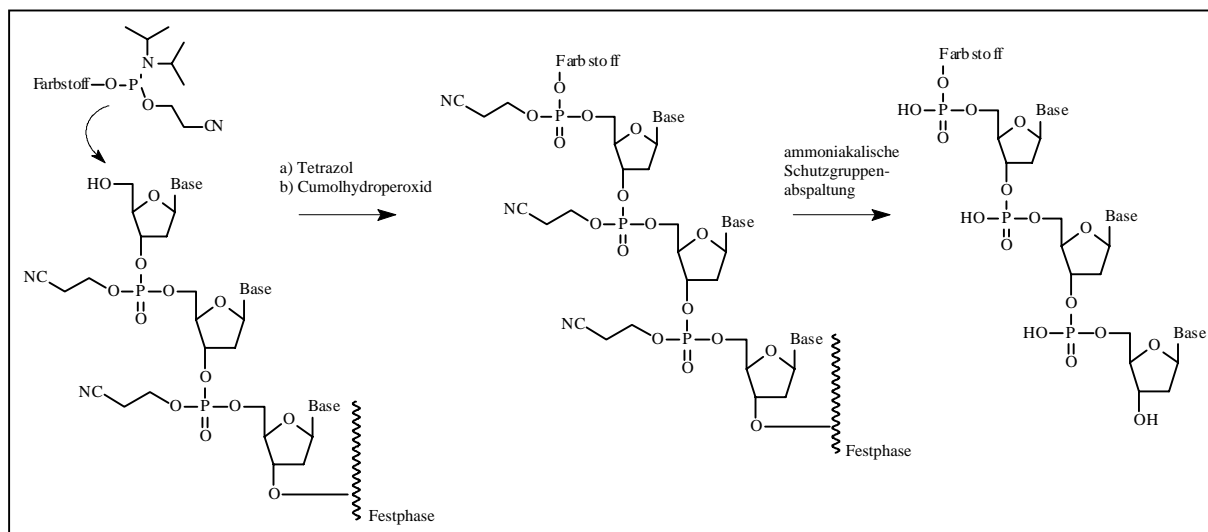


Abb. 27: Schematische Darstellung der Festphasensynthese eines 5'-OH-fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids

### c) Carbonsäure-reaktive Ankergruppen

Mit Hilfe sogenannter „zero-length cross-linker“ [131] wie zum Beispiel Carbodiimide können Amidgruppen zwischen Carbonsäuren und Aminen oder auch Phosphoramidate zwischen Phosphaten und Aminen gebildet werden [132-134]. Man unterscheidet zwischen wasserlöslichen Carbodiimiden wie zum Beispiel 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) oder wasserunlöslichen wie zum Beispiel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), welches seit 1955 als aktivierendes Agens in der Peptidsynthese eingesetzt wird [135]. Die aktivierende Wirkung beruht hierbei auf der Bildung eines intermediären O-Acylisoharnstoffes aus der Carbonsäure und dem Carbodiimid, welches durch den nucleophilen Angriff des Amins in das Amid und einen Isoharnstoff als Nebenprodukt übergeht [135](Abbildung 28).

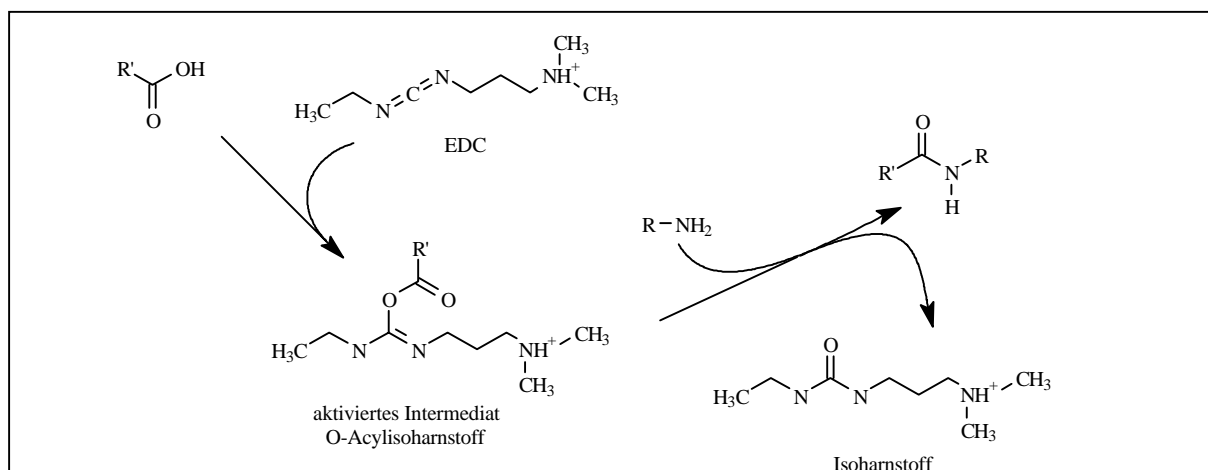


Abb. 28: Amidbildung aus Carbonsäure und Amin mittels Carbodiimid-Aktivierung

### 2.3.2 Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden

Moderne DNA-Sequenzierungstechniken und Systeme der Genexpressionskontrolle (DNA-Probing) sind erst durch die Entwicklung effektiver Markierungstechniken möglich geworden. Die anfängliche Radioaktivmarkierung [136,137] wurde dabei zunehmend durch Fluoreszenzmarker ersetzt [138-140]. Dabei kann der Marker entweder an das 3'- oder 5'-Ende eines Oligonukleotids [141-143], an die Phosphatbrücke zwischen zwei Nukleotiden [144-146], an die Ribose [147,148] oder die Nukleobase [149-153] über einen Spacer gekoppelt werden. Im Rahmen meiner Diplomarbeit entwickelte ich basierend auf der unter Abschnitt 2.3.1.2 dargestellten Phosphoramidit-Technik eine Methode zur Darstellung fluoreszenzmarkierter Mononukleotide [154]. Dabei wird die 5'-OH-Gruppe von Dicyanoethyl-geschützten Mononukleosid-3'-phosphaten unter Tetrazol-Aktivierung mit

einem Fluoreszenzfarbstoff-Phosphoramidit gekoppelt. Durch die anschließende ammoniakalische Entschützung werden die fluoreszenzmarkierten Nukleotide freigesetzt (Abbildung 29).

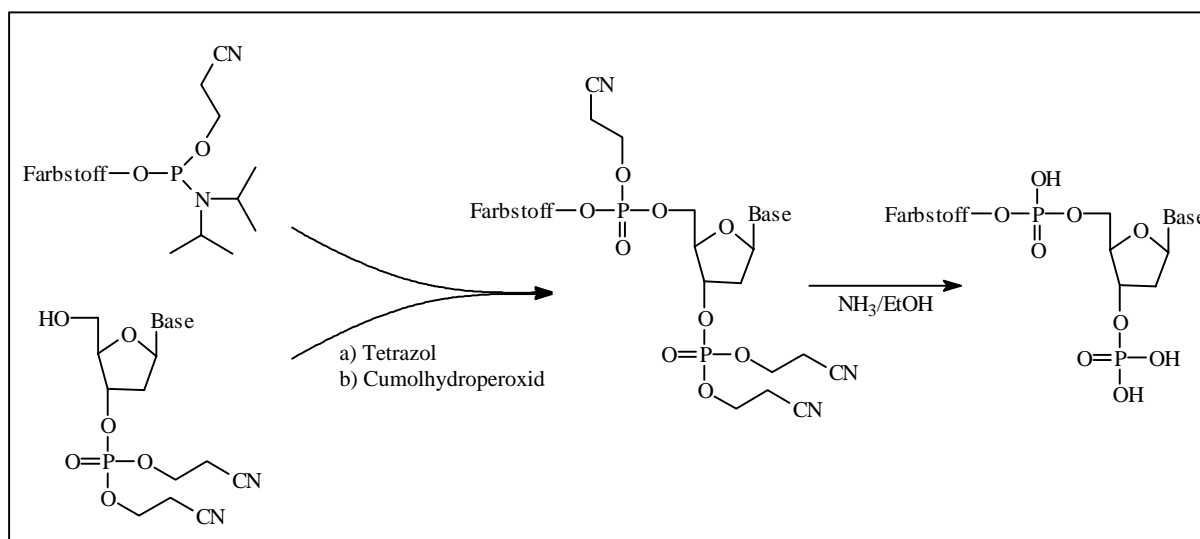


Abb. 29: Darstellung fluoreszenzmarkierter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate mittels Phosphoramidittechnik; Farbstoff = Hexachlorofluorescein

Auf diese Weise gelang die Darstellung fluoreszenzmarkierter N3-methylierter und butylierter Desoxythymidine sowie von unmodifiziertem Desoxythymidin.

*Chu et al.* stellten 1983 eine einfache und effiziente Methode vor, Mono- und Oligonukleotide in wässrigen Medien unter Carbodiimid-Aktivierung mit Ethylendiamin zu konjugieren [155]. Dabei wird das 5'-Phosphat-Ende der Nukleotide in ein reaktives Imidazolid überführt, welches in Anwesenheit von Aminen in 85%iger Ausbeute zu 5'-Phosphoramidaten umgesetzt werden kann.

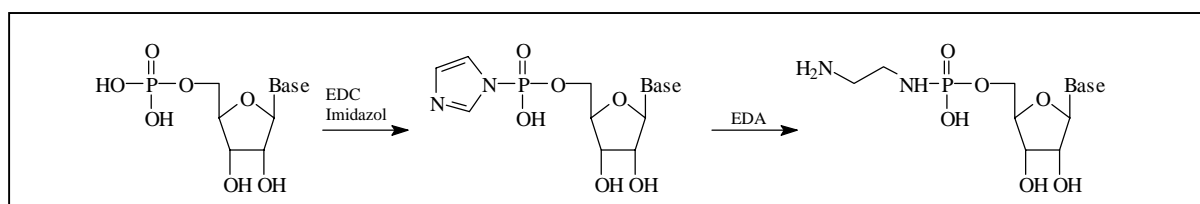


Abb. 30: Darstellung von Nukleosid-5'-ethylendiaminphosphoramidaten nach *Chu et al.*; Base = Uracil, Adenin, Cytosin oder Guanin;

Diese Synthesestrategie eröffnete nun die Möglichkeit, Amin-reaktive Fluoreszenzmarker über die generierte primäre Aminogruppe an Nukleotide zu koppeln. So beschrieb *Kelman et al* 1988 erstmals die Synthese dansylierter Desoxynukleosid-5'-Monophosphate durch

Umsetzung von 2'-Desoxynukleosid-5'-ethylendiamin-phosphoramidaten mit Dansylchlorid zu fluoreszenten Konjugaten [156].

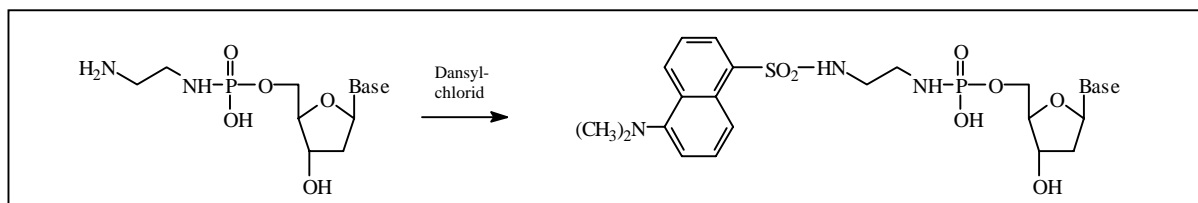


Abb. 31: Darstellung dansylierter 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphate nach *Kelman et al.*; Base = Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin;

Basierend auf dem gleichen Prinzip stellten *Al-Deen et al.* 1990 Fluorescein-konjugierte Nucleotide vor [157]. Auch hier wurden die 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphate nach *Chu et al.* [155] zuerst in Ethylendiamin-phosphoramidate überführt. Die Darstellung fluoreszenzmarkierter Nukleotide erfolgte dann durch Umsetzung der primären Aminogruppe mit Fluoresceinisothiocyanat, wobei eine stabile Thioharnstoff-Kopplung gebildet wird (Abbildung 32).

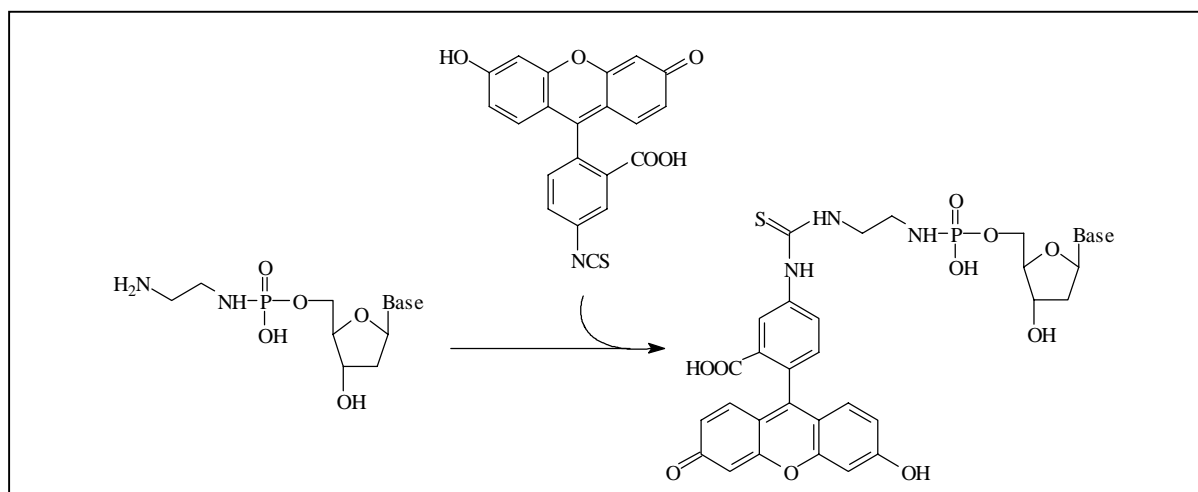


Abb. 32: Darstellung Fluorescein-markierter 2'-Desoxynukleosid-5'-monophosphate nach *Al-Deen et al.*; Base = Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin

*Wang* und *Giese* stellten 1993 eine Derivatisierungstechnik vor, die ebenfalls auf das beschriebene Prinzip der Konjugation einer Aminogruppe an die 5'-Phosphatgruppe von Mononukleotiden unter Carbodiimid-Aktivierung beruht [158]. Sie machten sich die von *Chu et al.* [155] beschriebene Imidazolid-Bildung zunutze, in dem sie einen an N-acetyl-L-histidin gekoppelten Fluorophor (BODIPY) einsetzten. Dieses Konjugat koppelt über den Imidazol-Ring des Histidins an die 5'-Phosphatgruppe der Mononukleotide unter Ausbildung eines

Nukleotid-Fluorophor-Imidazolidins (Abbildung 33). Da allerdings die N1- und N3-Position nicht äquivalent sind, kommt es bei jeder Reaktion zu regioisomeren Gemischen [159].

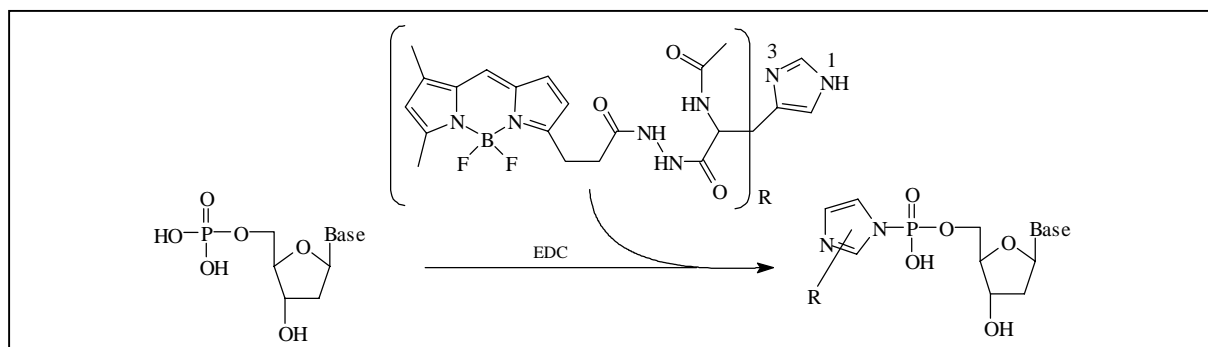


Abb. 33: Darstellung fluoreszenzmarkierter 2'-Desoxynukleotid-5'-monophosphate nach Wang und Giese;

### 3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte eine universell einsetzbare, automatisierbare Nachweismethode für DNA-Addukte entwickelt werden. Die erforderliche Sensitivität der Detektion modifizierter Nukleotide sollte durch die Ankopplung leistungsfähiger Fluoreszenzmarker erreicht werden. Dazu mußte eine chemische Derivatisierungsmethode von Nukleotiden aus enzymatisch hydrolysierten DNA entwickelt werden. Die mit einem signalgebenden Molekülteil markierten adduktierten und unmodifizierten Nukleotide sollten kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Laser-induzierter Fluoreszenz (LIF) detektiert und quantifiziert werden. Der qualitative Nachweis modifizierter Nukleotide sollte durch den Vergleich mit entsprechenden physiko-chemisch charakterisierten Standardverbindungen ermöglicht werden.

Viele der bisher entwickelten Nachweisverfahren umfassen relativ aufwendige Zwischenreinigungen zum Beispiel des DNA-Hydrolysates oder sind nur für eine bestimmte Adduktklasse anzuwenden. Um ein breites Anwendungsspektrum und einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen, sollte das zu entwickelnde Verfahren bestimmten Anforderungen entsprechen. So war die Durchführung der Derivatisierungsreaktion in dem DNA-Hydrolysat ohne vorherige Aufreinigung der Addukte zum Beispiel über HPLC eines der angestrebten Ziele. Ferner sollte sich das gesamte Verfahren durch milde Reaktionsbedingungen auszeichnen, um artifizielle Veränderungen des Adduktspektrums und der Adduktmengen zu vermeiden. Darüber hinaus sollte auch dem Umstand Rechnung getragen werden, daß biologisches Material als DNA-Quelle gerade im Bereich des humanen Biomonitorings nur in sehr begrenztem Maße zur Verfügung steht. Somit sollte eine Analytik entwickelt werden, die mit für das  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahren ausreichenden DNA-Mengen im Mikrogrammbereich durchzuführen ist.

Meine Arbeit unterteilt sich zur Lösung dieser Aufgabe in drei Teilbereiche:

1. Entwicklung einer effektiven Derivatisierungstechnik zur Fluoreszenzmarkierung addukturierter und unmodifizierter Mononukleotide in wäßrigem Medium.
2. Ausarbeitung geeigneter kapillarelektrophoretischer Trennbedingungen zur simultanen Separation fluoreszenzmarkierter DNA-Addukte unterschiedlicher genotoxischer Substanzfamilien.
3. Übertragung der erarbeiteten Konzepte und Technologien auf die Verhältnisse enzymatischer Hydrolysate addukturierter DNA.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine effektive und reproduzierbare Fluoreszenzderivatisierung von Mononukleotiden nach enzymatischer DNA-Hydrolyse entwickelt werden. Als Endprodukte des DNA-Verdaus ergeben sich durch die Verwendung unterschiedlicher Enzymsysteme 2'-Desoxymononukleoside [6], 2'-Desoxymononukleosid-5'-phosphate [156] oder 2'-Desoxymononukleosid-3'-phosphate [90].

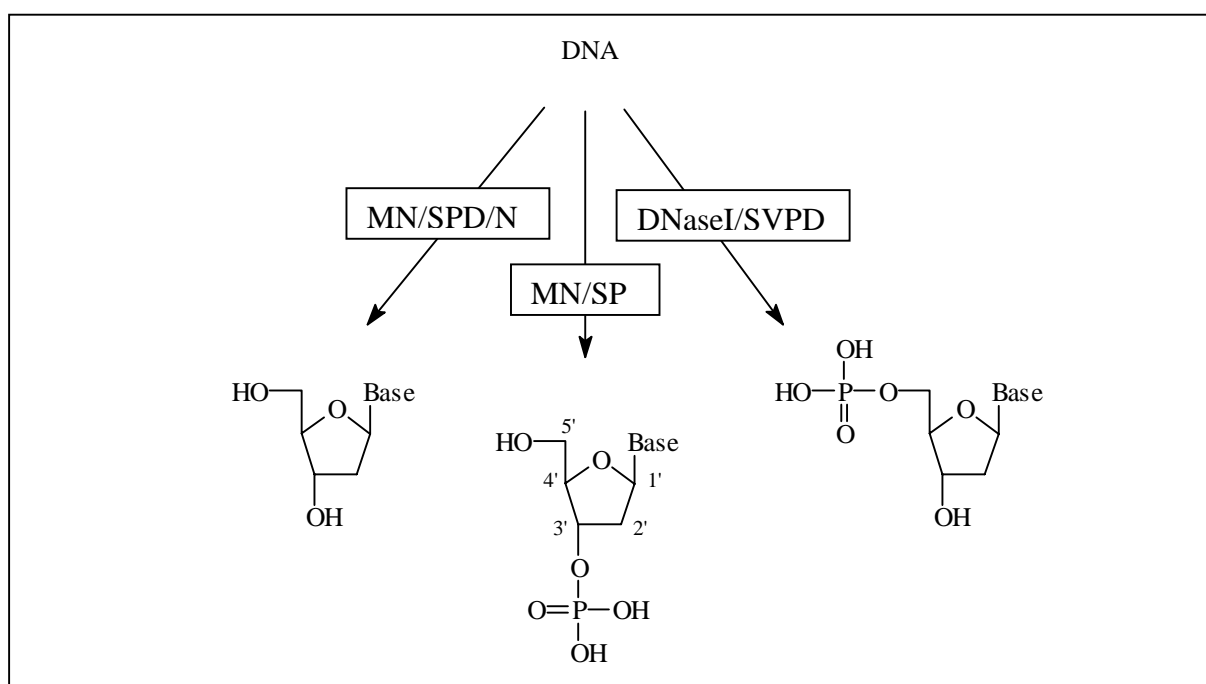


Abb. 34: Strukturen der Mononukleoside aus enzymatischer DNA-Hydrolyse; MN = Mikrokokkennuklease; SPD = Milzphosphodiesterase; NP1 = Nuklease P1; DNaseI = DNaseI aus Rinderbauchspeicheldrüse; SVPDE = Schlangengift-Phosphodiesterase aus *Crotalus atrox*

Prinzipiell eignen sich alle Hydrolyseprodukte als Ausgangsverbindungen für die Entwicklung einer Fluoreszenzderivatisierung. Da jedoch 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate als Substrate für die radioaktive Markierung im  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahren dienen, sind die Bedingungen der DNA-Hydrolyse mittels Milzphosphodiesterase und Mikrokokkennuklease validiert und standardisiert [90]. Daher und aus Gründen der Vergleichbarkeit mit dieser etablierten Methode sollte die Fluoreszenzderivatisierung für 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate entwickelt werden.

Um eine allgemeine Anwendbarkeit der zu entwickelnden Methode zu gewährleisten, darf die Fluoreszenzderivatisierung nicht durch die Natur der Basenmodifikationen beeinflusst werden.



Da die chemisch reaktiven Positionen der Basen wie die exozyklischen Aminogruppen im allgemeinen in die Adduktbildung involviert sind, wurde eine Kopplung des Fluoreszenzmarkers an das Zucker-Phosphat-Rückgrat angestrebt. Somit stehen zur Markierung die 3'-Phosphat- oder die 5'-OH-Gruppe der Desoxyribose zur Verfügung. Entsprechend den unter Abschnitt 2.3.2 aufgeführten Derivatisierungstechniken bieten sich dazu zwei unterschiedliche Strategien an:

1. Derivatisierung der 5'-OH-Gruppe unter Verwendung eines Fluoreszenzmarkers mit einer Phosphoramidit-Ankergruppe unter Ausbildung von Mononukleosid-3'-5'-bisphosphaten (Phosphoramidit-Methode).
2. Derivatisierung der 3'-Phosphatgruppe unter Verwendung eines Fluoreszenzmarkers mit einer Aminogruppe unter Ausbildung von Mononukleosid-3'-phosphoramidaten (Phosphoramidat-Methode).

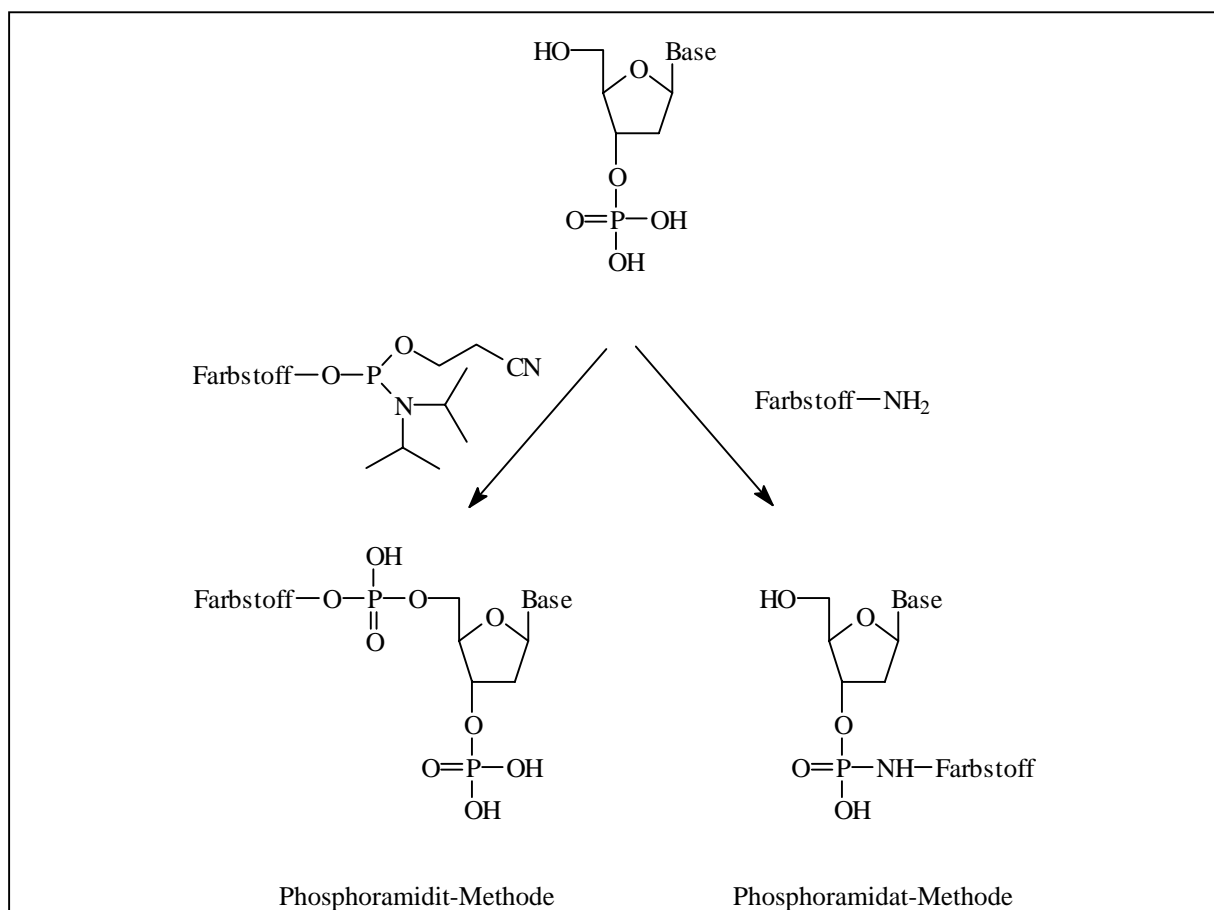


Abb. 35: Alternative Möglichkeiten der Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten

#### **4.1.1 Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden mittels Phosphoramidit-Methode**

Basierend auf dem in meiner Diplomarbeit entwickelten Verfahren zur Darstellung fluoreszenzmarkierter Mononukleosid-3'-phosphate aus partiell geschützten Mononukleosid-3'-phosphaten mittels Fluoreszenzmarker mit einer Phosphoramidit-Ankergruppe [154] sollten zunächst physiko-chemisch charakterisierte Referenzsubstanzen für die vier unmodifizierten Nukleotide Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymidin hergestellt werden. Anschließend sollte diese Strategie der Fluoreszenzmarkierung auf freie Mononukleosid-3'-phosphate aus enzymatischer DNA-Hydrolyse übertragen werden.

##### **4.1.1.1 Darstellung fluoreszenzmarkierter Referenzsubstanzen**

Die angewandte Synthesestrategie (Abbildung 36) geht von 5'-Dimethoxytrityl-desoxynukleosid-3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramiditen **1-4** aus, wie sie auch in der automatisierten Oligonukleotidsynthese eingesetzt werden. In diesen Ausgangsverbindungen sind die exozyklischen Aminofunktionen des Cytosins und des Adenins benzoylgeschützt, während die N<sup>2</sup>-Position des Guanosins durch eine Isobutyrylgruppe geschützt ist. Der erste Reaktionsschritt umfasst die Überführung der reaktiven Phosphoramidit-Gruppe in eine dicyanoethylgeschützte Phosphat-Gruppe. Dazu werden die Nukleosid-Phosphoramidate unter Feuchtigkeitsausschluß in Acetonitril unter Tetrazol-Aktivierung mit Hydroxypropionsäurenitril umgesetzt. Durch Zugabe von Cumolhydroperoxid wird der so gebildete Phosphittriestер zu den dicyanoethylgeschützten 3'-Phosphaten **5-8** oxidiert. Diese nun vollständig geschützten Nukleosid-3'-phosphate zeichnen sich dadurch aus, daß die säurelabile Dimethoxytrityl-Schutzgruppe an der 5'-OH-Position der Desoxyribose durch Zinkbromid in Nitromethan selektiv abgespalten werden kann. Alternativ zur verwendeten Lewis-Säure kann auch ein saurer Ionenaustauscher eingesetzt werden. Die so erhaltenen dicyanoethylgeschützten 5'-OH-Nukleosid-3'-Phosphate **9-12** dienen als Ausgangsverbindungen für die Derivatisierung mit einem Fluoreszenzmarker mit Phosphoramidit-Ankergruppe. Analog des ersten Reaktionsschrittes zur Darstellung der vollständig geschützten Nukleotide wird hierbei ein Fluoreszenzmarker mit einer Phosphoramidit-Ankergruppe unter Tetrazol-Aktivierung selektiv an die 5'-OH-Gruppe der Desoxyribose gekoppelt (Abbildung 37).

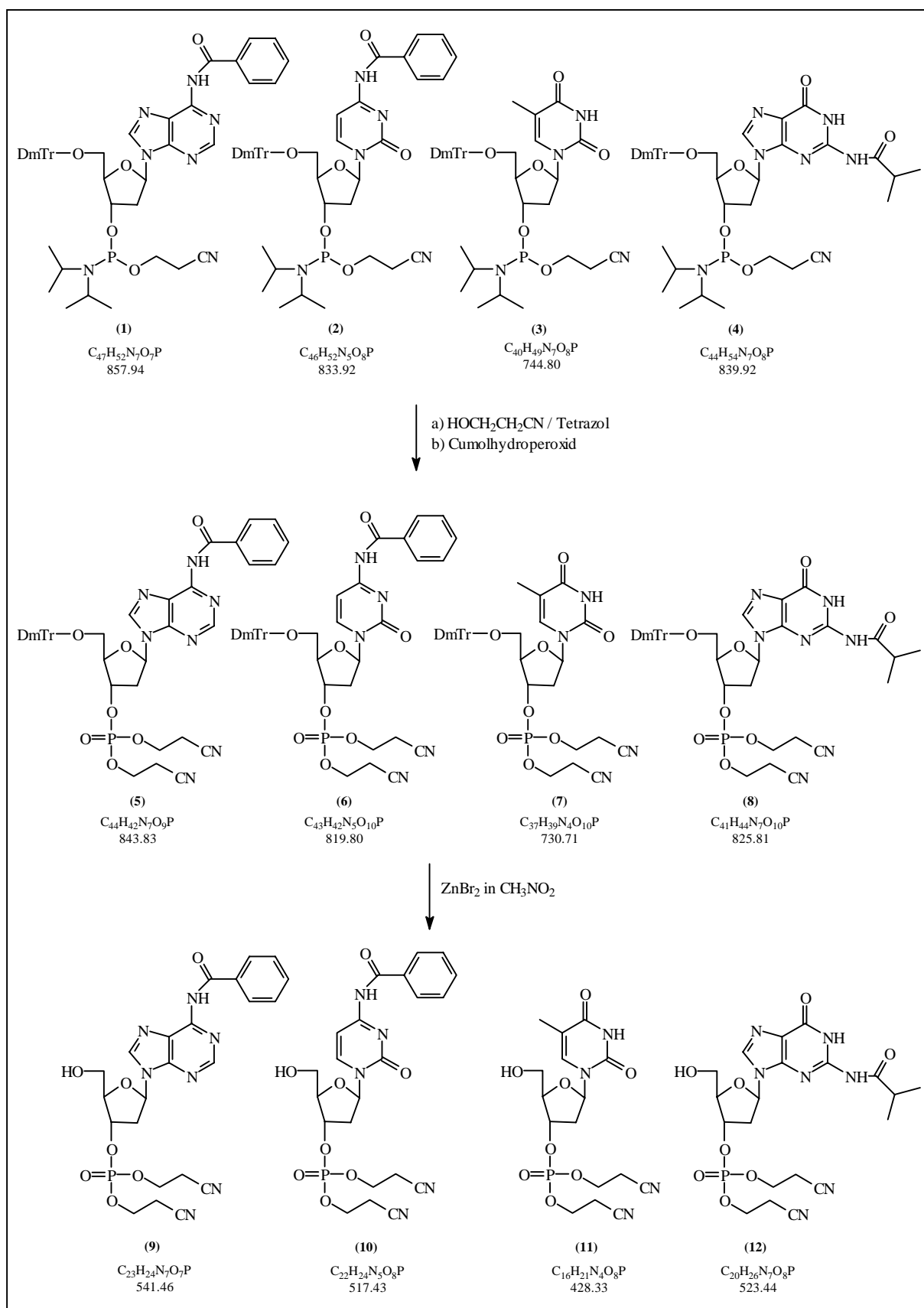


Abb. 36: Darstellung der Ausgangsverbindungen zur Fluoreszenzmarkierung mittels Phosphoramidit-Technik; DmTr = Dimethoxytrityl-;

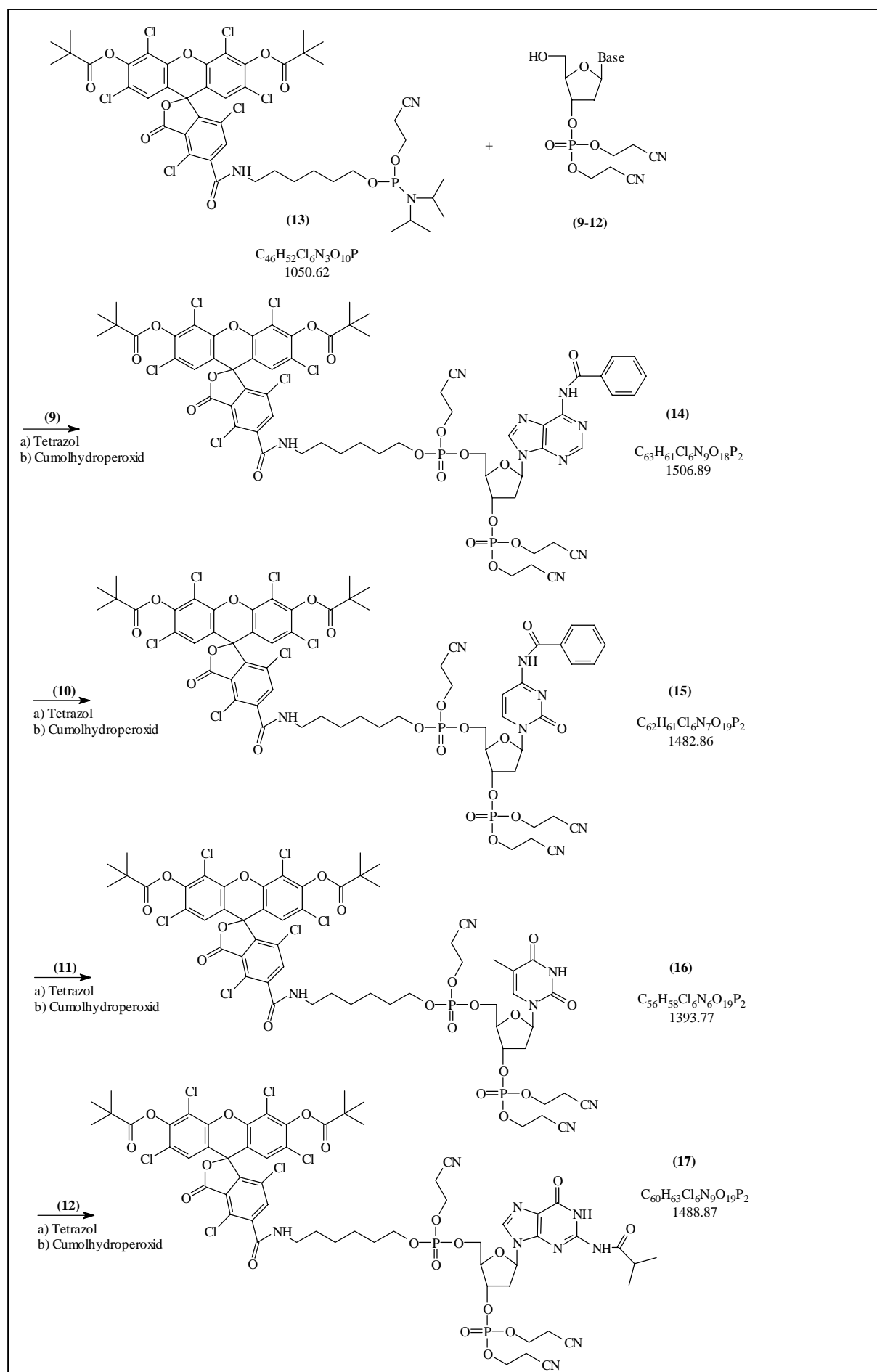


Abb. 37: Konjugation des Fluoreszenzmarker-Phosphoramidits an selektiv entschtzte 5'-OH-Nukleotide

Der dabei eingesetzte Fluoreszenzmarker **13** besteht aus einem Dipivaloyl-ester-geschütztem Fluoresceinderivat, welches über einen C6-Spacer mit der Ankergruppe verknüpft ist. Aufgrund dieser Pivaloyl-Schutzgruppen wird die Umsetzung des Markers in Acetonitril ermöglicht. Abbildung 38 zeigt den abschließenden Reaktionsschritt, in dem die mit dem geschützten Fluoreszenzmarker gekoppelten Nukleotide **14-17** durch Umsetzung mit Ammoniak in die freien fluoreszierenden Konjugate überführt werden. Dabei werden sowohl die Schutzgruppen der exozyklischen Aminogruppen des Adenins, Cytosins und Guanins als auch die Pivaloyl-Gruppen des Fluorophors und die Cyanoethylgruppen der Phosphate abgespalten. Kapillarelektrophoretische Untersuchungen der Reaktionskinetik dieser Umsetzung ergaben, daß die bei der automatisierten Oligonukleotidsynthese angewendeten Reaktionsbedingungen keine vollständige Freisetzung der Cyanoethylgruppen sicherstellen, während die übrigen Gruppen leicht abzuspalten waren [154]. So mußte anstatt einer 25%igen ethanolischen Ammoniaklösung konzentrierter wäßriger Ammoniak eingesetzt werden und die Inkubationsdauer von 4h bei 55°C auf 6h bei 55°C erweitert werden, um eine vollständige Entschützung zu gewährleisten.

Die Ausbeuten der einzelnen Reaktionsschritte sind in hohem Maße von der Güte der verwendeten Lösungsmittel und den stöchiometrischen Verhältnissen abhängig. So ist bei der Umsetzung von Phosphoramiditen besonders auf den Ausschluß von Feuchtigkeit zu achten, um eine hydrolytische Zersetzung dieser Gruppen zu vermeiden. Die Ausbeuten für die Synthese der vollständig geschützten Nukleotide **5-8** betragen zwischen 60 und 80%. Die anschließende Abspaltung der Dimethoxytrityl-Gruppe gelang bei allen durchgeführten Reaktionen mit schlechten Ausbeuten von selten mehr als 50%. Dies kann mit dem Umstand zusammenhängen, daß die säulenchromatographische Aufreinigung über Kieselgel durch die Zunahme der Polarität der Substanzen durch die freie Hydroxy-Gruppe erschwert war. Aufgrund der ausreichenden Verfügbarkeit der Ausgangssubstanzen wurde aber auf eine Optimierung der Chromatographie verzichtet. Im Gegensatz zu den bisher angesprochenen Verbindungen stellt die Verfügbarkeit des Fluoreszenzmarkers **13** aufgrund seines Preises einen limitierenden Faktor dar. Die erzielten Ausbeuten für die Kopplung des Fluoreszenzmarkers an die partiell entschützten Nukleotide **9-12** betrugen je nach eingesetztem Überschuß des Fluoreszenzmarkers zwischen 80% (4facher Überschuß) und 50% (1,5facher Überschuß). Höhere Ausbeuten wären durch Einsetzen des Markers in größerem Überschuß zu erzielen gewesen, doch dies hätte aufgrund der damit verbundenen hohen Kosten einen unverhältnismäßigen finanziellen Aufwand dargestellt.

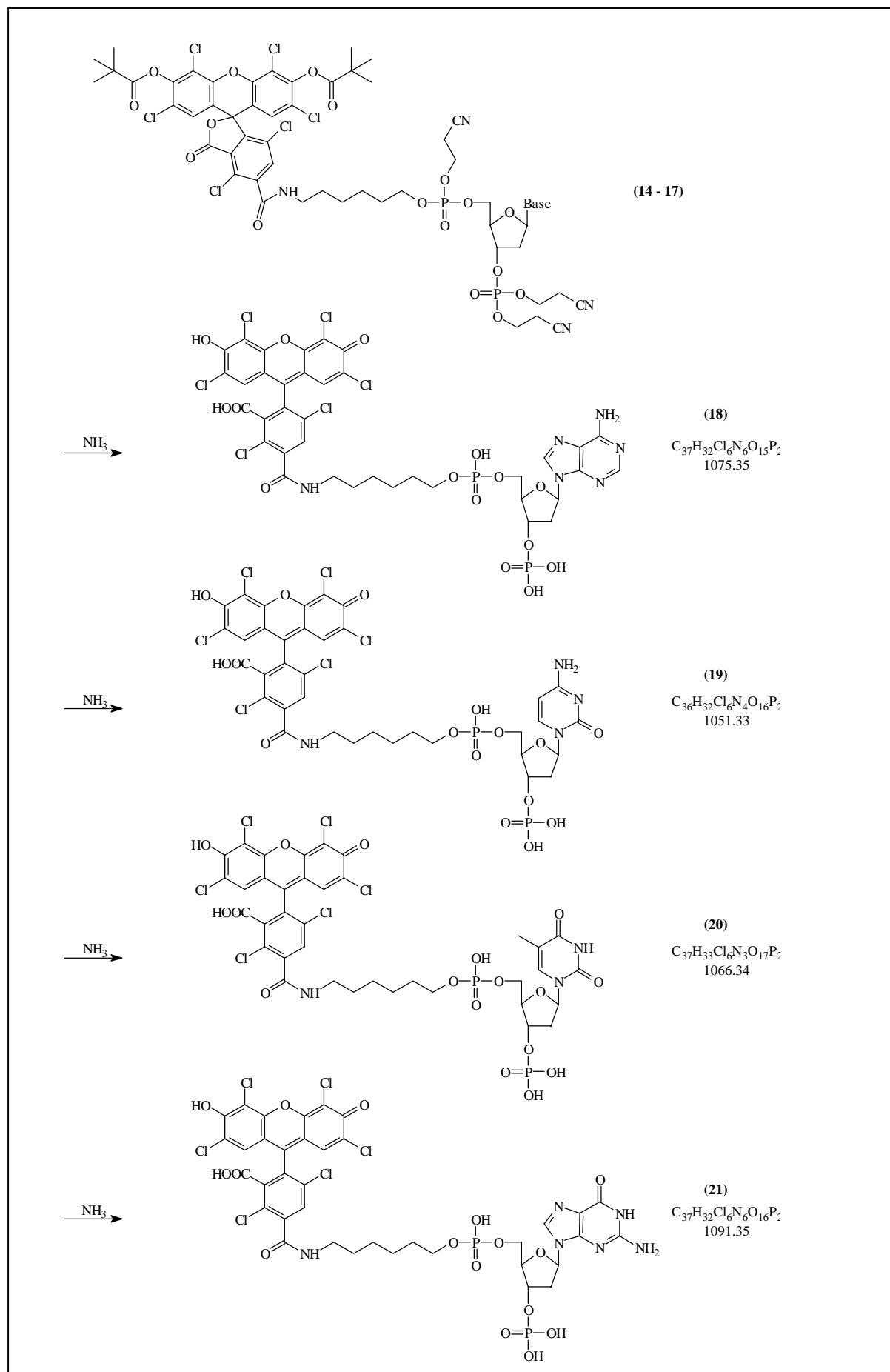


Abb. 38: Basische Entschützung fluoreszenzmarkierter Nukleotide

Die Ausbeute der abschließenden ammoniakalischen Entschützung zu den fluoreszenten Endprodukten **18-21** betrug 50 – 75%. Ausschlaggebend hierbei ist sicherlich die lange erforderliche Inkubationszeit mit konzentriertem Ammoniak zur vollständigen Abspaltung der Cyanoethylgruppen, die wahrscheinlich zu einer teilweisen Zersetzung der Produkte führt. Die Charakterisierung der dargestellten Verbindungen erfolgte über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie.

Somit eröffnet sich durch diese Synthesestrategie ein Weg der einfachen und effektiven Darstellung von Referenzsubstanzen. Die Verfügbarkeit solcher physiko-chemisch charakterisierten Standards ist von essentieller Bedeutung für die Identifikation der kapillarelektrophoretisch zu trennenden fluoreszenzmarkierten Nukleotide.

#### 4.1.1.2 Fluoreszenzderivatisierung freier Nukleosid-3'-phosphate

Nach der erfolgreichen Synthese fluoreszenzmarkierter Standardverbindungen sollte die für partiell geschützte Standardverbindungen etablierte Derivatisierungsstrategie auf freie Nukleosid-3'-phosphate, wie sie durch enzymatische Hydrolyse genomischer DNA entstehen, übertragen werden. Dabei galt es, zwei Fragen zu klären:

1. Ist das für Reaktionen in wasserfreiem Acetonitril ausgearbeitete Konzept der Kopplung eines Fluoreszenzmarkers an die 5'-OH-Position geschützter Nukleotide über eine Phosphoramidit-Ankergruppe auch in polaren Lösungsmitteln, wie sie für Umsetzungen freier Nukleotide erforderlich sind, erfolgreich?
2. Stellen die exozyklischen Aminogruppen der freien Nukleotide Adenosin, Cytidin und Guanosin zusätzliche Derivatisierungspositionen für die Phosphoramidit-Gruppe des Fluoreszenzmarkers dar?

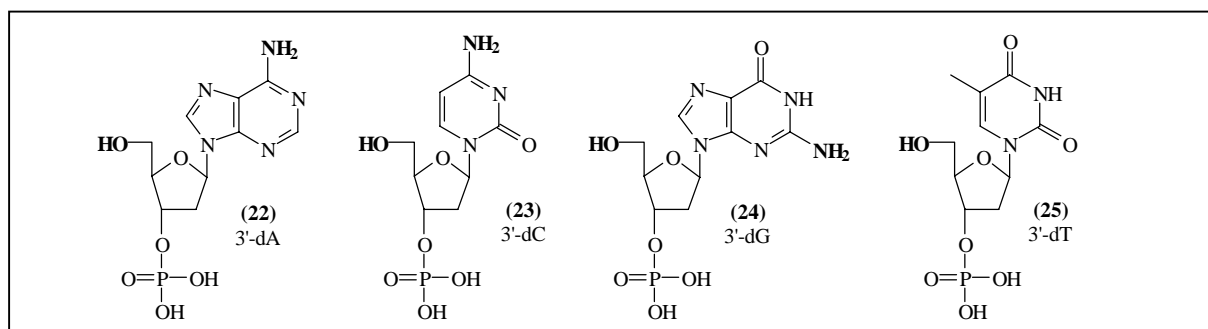


Abb. 39: Strukturen der freien Desoxynukleosid-3'-monophosphate mit ihren durch Phosphoramidite potentiell derivatisierbaren Positionen; 3'-dA = 2'-Desoxyadenosin-3'-monophosphat; 3'-dC = 2'-Desoxycytidin-3'-monophosphat; 3'-dG = 2'-Desoxyguanosin-3'-monophosphat; 3'-dT = 2'-Desoxythymidin-3'-monophosphat

Die Fluoreszenzmarkierung dieser Substanzen sollte zwei Reaktionsschritte beinhalten. Als ersten Schritt erfolgt die Kopplung des Fluorescein-Amidits **13** an das 5'-OH-Ende der Nukleosid-3'-Phosphate **22-25** (Abbildung 39) unter Ausbildung cyanoethylgeschützter 5'-Fluoresceinyl-phosphatidyl-nukleosid-3'-phosphate **26-29** gefolgt von der abschließenden ammoniakalischen Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen unter Freisetzung der Zielmoleküle in ihrer fluoreszierenden Form **30-33** (Abbildung 40).

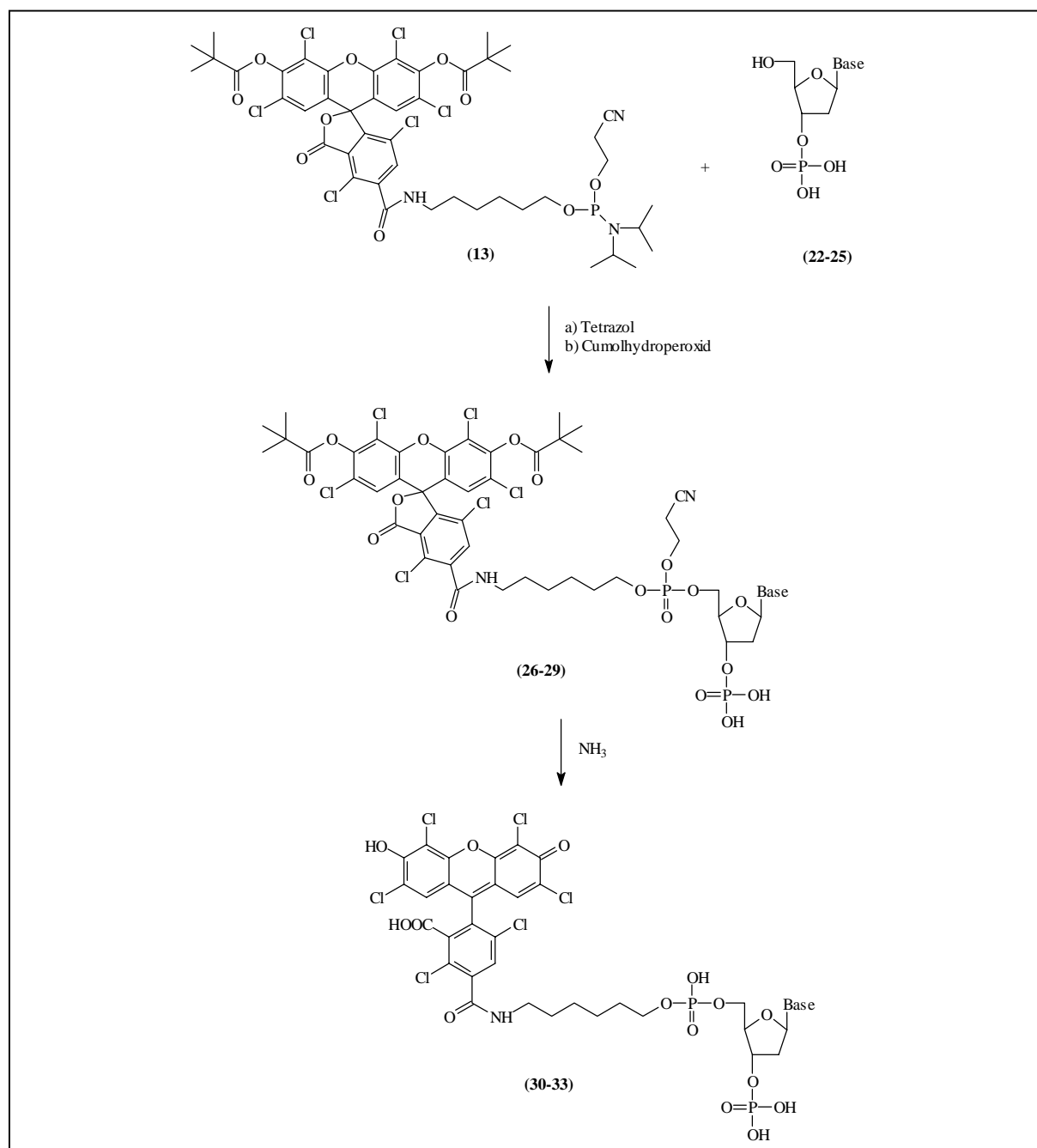


Abb. 40: Strategie der Fluoreszenzmarkierung freier Nukleosid-3'-phosphate mittels Phosphoramidit-Technik



Da Umsetzungen in Wasser als Lösungsmittel aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Phosphoramidit-Ankergruppe des Fluoreszenzmarkers ausgeschlossen waren, wurden Umsetzungen in polaren, aprotischen Lösungsmitteln durchgeführt. In ersten Versuchen wurde jeweils ein Äquivalent Nukleotid mit 3 Äquivalenten Fluoreszenzmarker unter Tetrazolaktivierung in Dimethylformamid (DMF) umgesetzt und ein Teil des Reaktionsansatzes ohne vorherige Aufreinigung mit Ammoniak inkubiert. Als Reaktionskontrolle diente die ESI-Massenspektrometrie. Es zeigte sich, daß die Umsetzungen unter diesen Bedingungen prinzipiell erfolgreich verlaufen. Alle vier erwarteten cyanoethylgeschützten 5'-Fluoresceinyl-phosphatidyl-nukleosid-3'-phosphate **26-29** lassen sich in den Massenspektren der Reaktionslösungen nachweisen. So führt beispielsweise die Reaktion von 3'-dA **22** mit dem Fluoreszenzmarker **13** hauptsächlich zu 3 Reaktionsprodukten der Molekulargewichte 982, 1296 und 2262 (Abbildung 41). Das Reaktionsprodukt der Masse 982 entspricht dem zum Phosphat hydrolysierten Fluoresceinphosphoramidit. Bei dem Produkt der Masse 1296 ist aufgrund des Massenspektrums nicht eindeutig zu klären, ob es sich um das erwünschte cyanoethylgeschützte 5'-Fluoresceinyl-phosphatidyl-adenosin-3'-phosphat **26** oder einem über die N<sup>6</sup>-Aminogruppe der Base gekoppeltes Produkt handelt. Das Reaktionsprodukt der Masse 2262 läßt den Schluß zu, daß eine Kopplung sowohl über die 5'-OH-Gruppe der Desoxyribose als auch über die exozyklische Aminofunktion möglich ist.

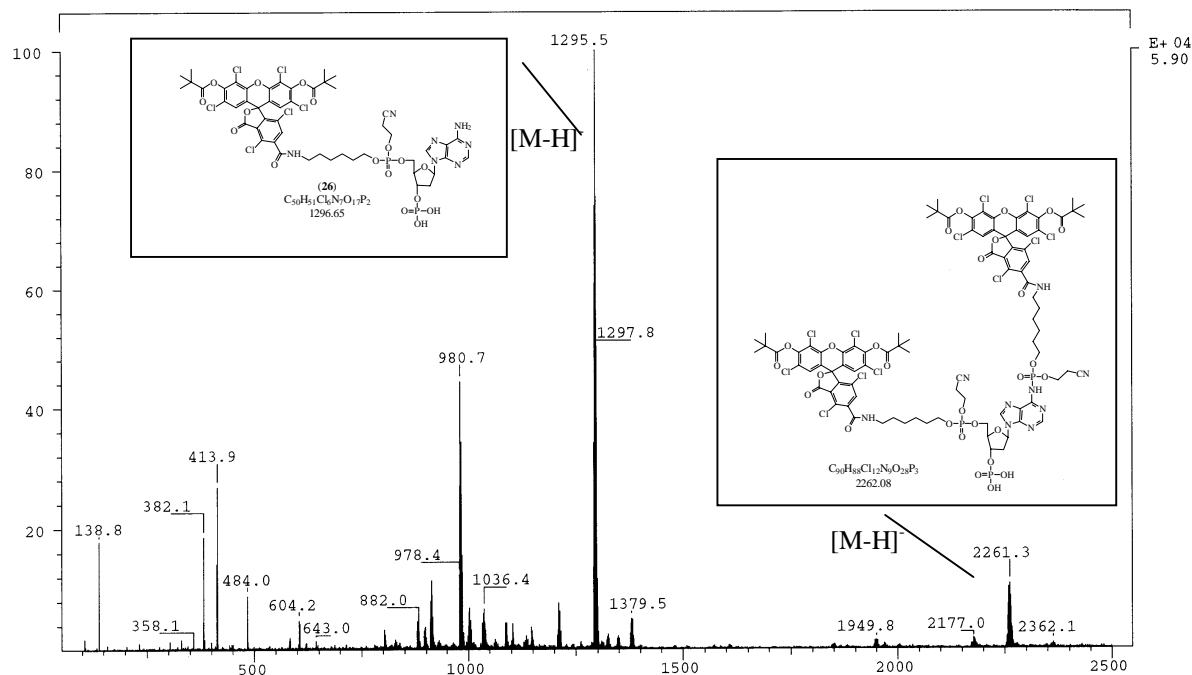


Abb. 41: -Q1-ESI-Massenspektrum der Umsetzung von 3'-dA **22** mit Fluorescein-phosphoramidit **13**

Mehrfachmarkierungen konnten auch bei den Umsetzungen mit Guanosin und Cytidin nachgewiesen werden. Lediglich die Umsetzung mit 3'-dT führt aufgrund des Fehlens einer exozyklischen Aminogruppe zu einfachmarkierten Spezies (Abbildung 42).

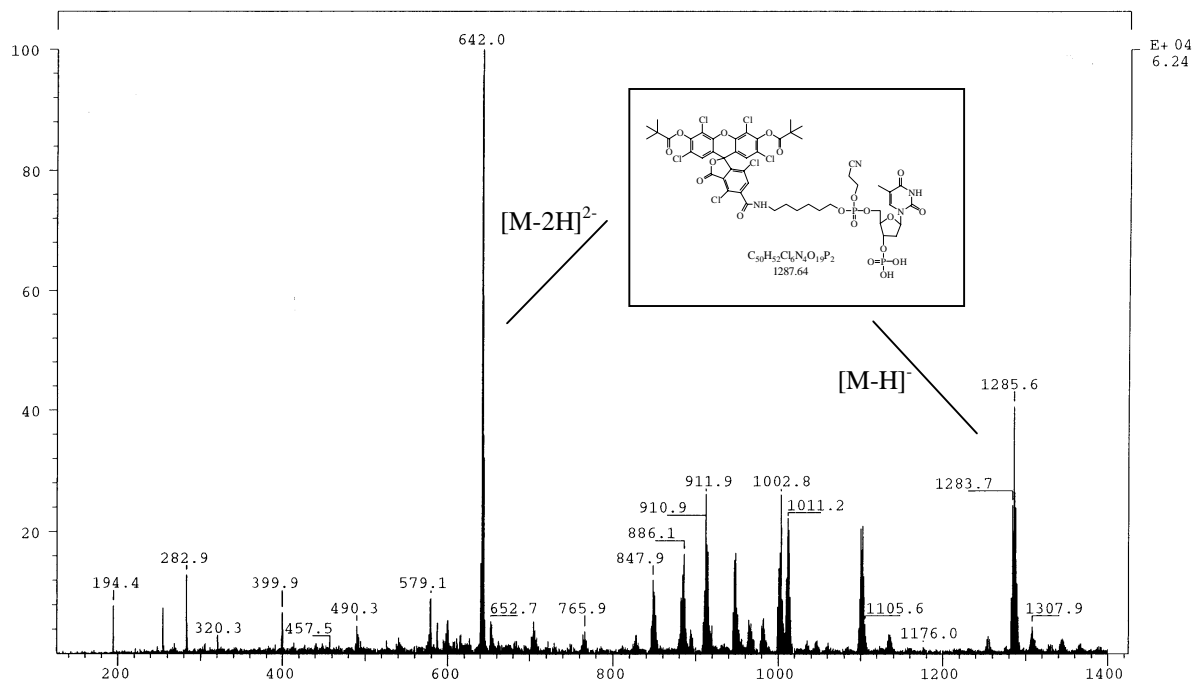


Abb. 42: -Q1-ESI-Massenspektrum der Umsetzung von 3'-dT **25** mit Fluorescein-phosphoramidit **13**

Die Möglichkeiten, diese Kopplungsreaktion zu optimieren, waren sehr beschränkt. Eine Erhöhung der Kopplungsrate durch das Einsetzen eines deutlich größeren Überschusses an Fluoreszenzmarker scheitert an der sehr begrenzten Löslichkeit des durch die Pivaloylschutzgruppen unpolaren Fluorophors in DMF. Die Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) ist wegen der zu geringen Löslichkeit der Mononukleotide in diesem Lösungsmittel nicht möglich. Versuche, die Reaktion in einer Mischung aus DMF und in Acetonitril gelöstem Fluoresceinphosphoramidit durchzuführen, scheiterte an der zu geringen Löslichkeit von 3'-dC in diesem System. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur über Raumtemperatur führte zur schnelleren Hydrolyse der Phosphoramidit-Gruppe. Eine Möglichkeit eröffnete sich durch die Verwendung von 4,5-Dicyanoimidazol anstatt 1*H*-Tetrazol als aktivierendes Agens [160]. 4,5-Dicyanoimidazol halbiert in der automatisierten Oligonukleotidsynthese die Reaktionszeit aufgrund seiner deutlich höheren Löslichkeit in den verwendeten Lösungsmitteln. Ferner besitzt diese Verbindung eine größere Nukleophilie durch den elektronenziehenden Effekt der Cyanogruppen. Doch auch diese Modifikation führte zu keiner verbesserten Kopplungsausbeute.

Als problematisch erwies sich zudem die Abspaltung der Cyanoethylgruppe der Phosphodiesterbrücke und der Pivaloylgruppen des Fluoresceins durch Inkubation mit Ammoniak. Lediglich fluoreszenzmarkiertes 3'-dT wurde innerhalb von 5 Stunden bei Raumtemperatur vollständig entschützt. Die Kopplungsprodukte von 3'-dA, 3'-dC und 3'-dG ließen sich unter diesen Reaktionsbedingungen nur teilweise entschützen. Abbildung 43 zeigt, daß bei der Entschützung des 3'-dA-Konjugats sowohl Cyanoethyl wie auch die Pivaloyl-Reste des Fluorophors in beträchtlichem Maße im Molekül verbleiben, während Abbauprodukte des Fluoreszenzmarkers in hohem Maß gebildet werden. Diese können anhand des charakteristischen Isotopenmusters, hervorgerufen durch die sechs Chloratome, erkannt werden

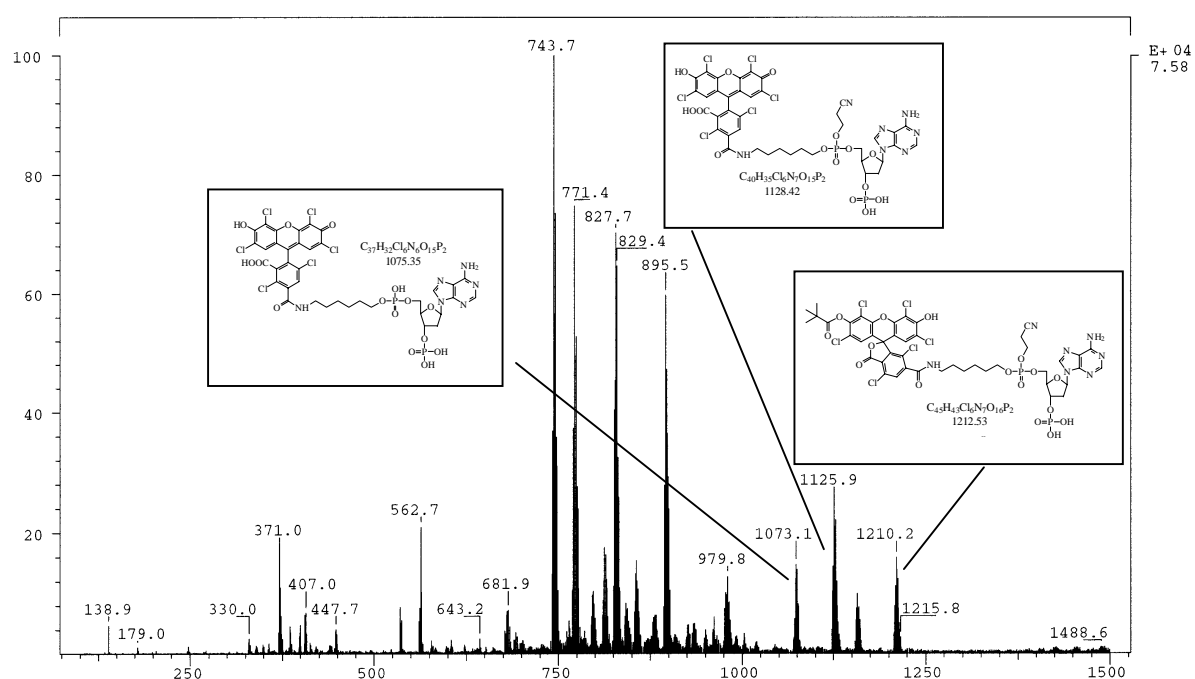


Abb. 43: -Q1-ESI-Massenspektrum der Ammoniakinkubation von 5'-Fluoresceinyl-phosphatidyl-adenosin-3'-phosphat

Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur oder eine deutlich längere Reaktionszeit führte in allen Fällen zu vollständiger Zersetzung der gebildeten Konjugate.

#### 4.1.1.3 Diskussion

2'-Desoxyribonukleosid-phosphoramidite sind die üblichen Monomere der automatisierten Festphasensynthese von Oligonukleotiden. Der Schlüsselschritt dieser Synthesestrategie besteht in der Tetrazol-katalysierten Kopplung eines Phosphoramidits mit der 5'-OH-Gruppe

eines geeignet geschützten Nukleosids. Der Mechanismus dieser Kopplung wurde von *Dahl et al.* 1987 aufgeklärt [161] und ist in Abbildung 44 dargestellt. In einem ersten Schritt wird der dreiwertige Phosphor durch 1*H*-Tetrazol protoniert (Abb. 44a), was zu einer Substitution des *N,N*-Diisopropylamin-Rests durch Tetrazol führt (Abb. 44b). Dieses intermediär gebildete Tetrazolid reagiert dann sehr schnell mit der 5'-OH-Gruppe zu einem Phosphittriestern (Abb. 44c). In der nachfolgenden Oxidation mittels Iod oder Cumolhydroperoxid wird dieses Phosphit in den cyanoethylgeschützten Phosphorsäurediester überführt (Abb. 44d).

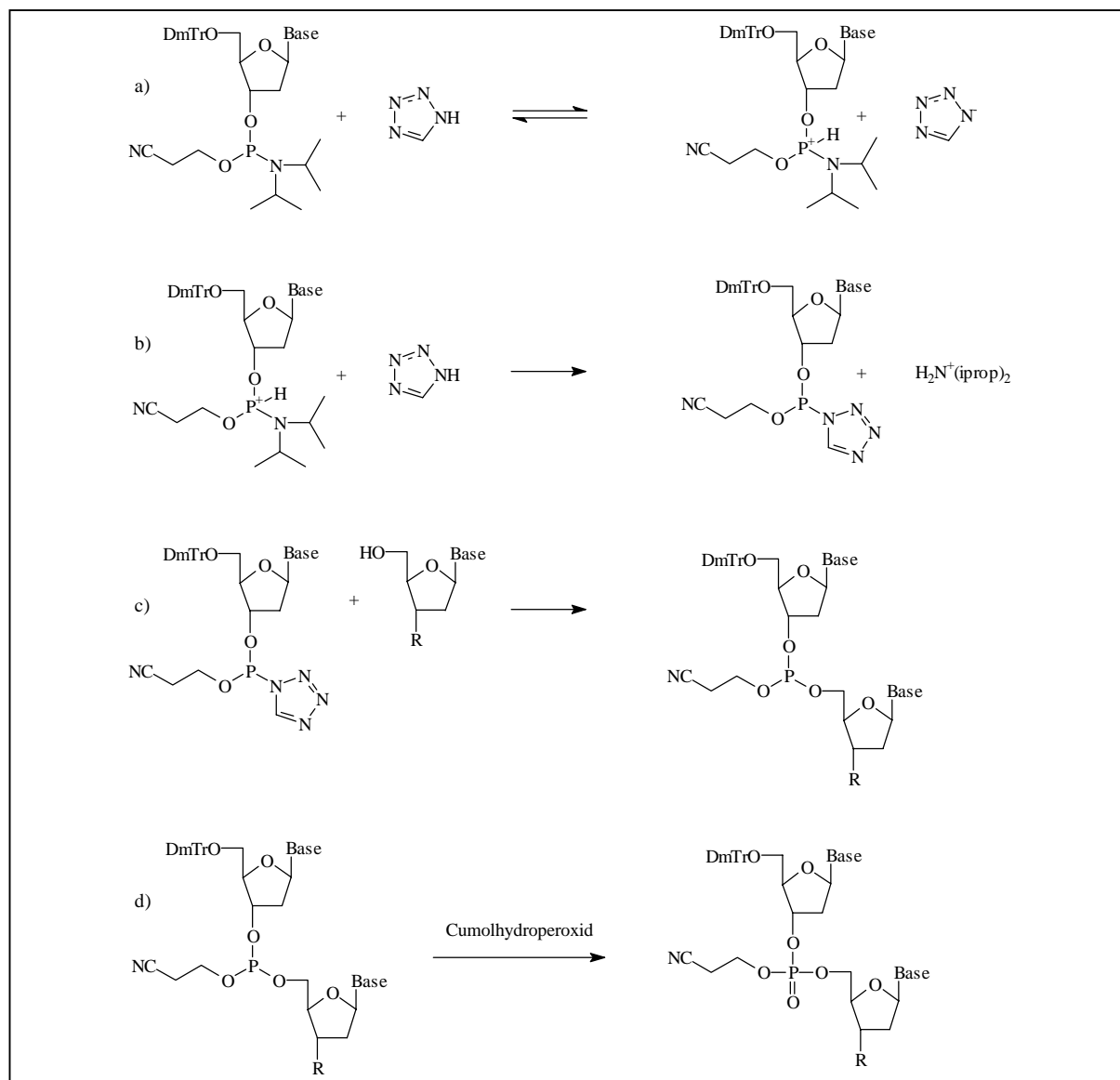


Abb. 44: Mechanismus der Tetrazol-aktivierten Kopplung eines Phosphoramidits an eine Alkohol-Gruppe

Diese Synthesestrategie konnte erfolgreich zur Darstellung der vollständig geschützten 2'-Desoxymononukleosid-3'-phosphate **5-8** aus kommerziell erhältlichen Phosphoramidaten durch Verwendung von Hydroxypropionsäurenitril als Alkoholkomponente angewendet werden. Ebenso erfolgreich verlief die Kopplung des Hexachlorfluorescein-phosphoramidits

**13** an die selektiv 5'-OH-entschützten Nukleotide **9-12**. Durch die Inkubation mit konzentriertem Ammoniak ließ sich aus den gebildeten vollständig geschützten 5'-Fluoresceinyl-phosphatidyl-2'-desoxynukleosid-3'-phosphaten **14-17** die freien, fluoreszenzmarkierten Zielverbindungen **18-21** darstellen. Somit konnte gezeigt werden, daß sich diese Strategie zur Darstellung definiert fluoreszenzmarkierter, physiko-chemisch charakterisierter Standardverbindungen eignet. Dies ist umso bedeutender, da mittlerweile einige modifizierte Nukleotide wie zum Beispiel 8-Oxo-Guanosin, etheno-Adenosin oder 5-Methyl-Cytidin als Ausgangsverbindungen für die Oligonukleotidsynthese in Form geeignet geschützter Phosphoramidite kommerziell erhältlich sind. Die entwickelte Fluoreszenzmarkierung könnte somit zur Darstellung fluoreszenzmarkierter DNA-Addukt-Standardverbindungen dienen. Der Einsatz von 4,5-Dicyanoimidazol anstelle von 1*H*-Tetrazol als Aktivator eignet sich zur Reaktionsoptimierung. *Vargeese et al.* beschrieben 1998, daß die Verwendung von frisch umkristallisiertem 4,5-Dicyanoimidazol die Reaktionsgeschwindigkeit der Kopplungsreaktion verdoppelt [160] und somit Ausbeuteverluste zum Beispiel durch Hydrolyse der Phosphoramidit-Gruppe deutlich verringert. Der beschleunigende Effekt dieses Aktivators besteht in seiner deutlich größeren Nukleophilie gegenüber Tetrazol und der effektiveren Bildung des intermediär auftretenden Imidazolid. Darüber hinaus ermöglicht die bessere Löslichkeit des Dicyanoimidazols in Acetonitril den Einsatz 1M Aktivator-Lösungen, während Tetrazol lediglich in einer Konzentration von 0,45M eingesetzt werden kann.

Die Übertragung dieses Konzeptes der Fluoreszenzmarkierung durch Fluoreszenzmarker mit einer Phosphoramidit-Ankergruppe auf die freien 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate **22-25**, wie sie durch enzymatische DNA-Hydrolyse erhalten werden, gelang nur bedingt. Haupthinderungsgrund stellten die unterschiedlichen Lösungseigenschaften der Reaktanden dar. Freie 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate sind aufgrund ihrer Hydrophilie nur sehr begrenzt in aprotischen, polaren Lösungsmitteln wie DMF oder DMSO löslich. Besonders problematisch erwies sich 2'-Desoxycytosin-3'-monophosphat, welches in DMF keine ausreichende Löslichkeit besitzt. So sind 1 mM Lösungen bereits deutlich getrübt und die Zugabe von in Acetonitril gelöstem Fluoreszenzmarker führte zu Niederschlagsbildung. Dennoch konnten Kopplungsprodukte massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Die geringe Zugabe von Wasser wie bei *Al-Deen et al.* [157], führten vermutlich aufgrund vollständiger Hydrolyse des Phosphoramidits zu keinerlei Umsetzung. Neben dem deutlich hydrophileren Charakter der freien Nukleotide **22-25** im Vergleich zu den geeignet geschützten Nukleotiden **9-12** stellten die freien, exozyklischen Aminogruppe von Adenin, Cytosin und Guanin ein nicht zu lösendes Problem dar. Das intermediär aus Phosphoramidit

durch Tetrazolaktivierung gebildete Tetrazolid wird auch durch freie Aminogruppen angegriffen. *Chen et al.* [162-164] sowie *Nelson et al.* [165] beschreiben die Bildung von Oligodesoxyribonukleotid-N3'-P5'-phosphoramidaten durch Kopplung eines Nukleosid-5'-phosphoramidates an ein Nukleosid-3'-amin unter Ausbildung eines Phosphoramidats. Aus diesem Grund konnten bei der Umsetzung des Hexachlorofluorescein-phosphoramidats **13** mit den ungeschützten Nukleotiden **23-25** mehrfachmarkierte Spezies massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Für die Nukleotide Adenosin, Cytidin und Guanosin ergeben sich jeweils drei mögliche markierte Spezies, was zu einem komplexen Signalmuster bereits der Standardverbindungen bei der kapillarelektrophoretischen Trennung führen würde.

Ein weiterer Nachteil dieser Derivatisierungsstrategie besteht darin, daß die abschließende Ammoniakinkubation der geschützten 5'-Fluoresceinyl-phosphatidyl-nukleosid-3'-phosphate **14-17** zu Gemischen nur partiell entschützter Reaktionsprodukte führte.

Diese Vorversuche zeigten, daß die Idee, freie 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate durch Fluoreszenzmarker, die über eine Phosphoramidit-Ankergruppe verfügen, zu derivatisieren, nicht praktikabel ist. Selbst im Falle deutlich höherer Kopplungsausbeuten steht das Problem der Mehrfachmarkierung und der mangelhaften Entschützung einer breiten Anwendung dieser Methodik zum Nachweis von geringen Mengen modifizierter Nukleotide entgegen. Darüber hinaus sollte sich die zu entwickelnde Derivatisierungsmethode durch schonende Reaktionsbedingungen auszeichnen, um das zu untersuchende Adduktmuster nicht artifiziell zu verändern. Da die erzielten Ergebnisse den Schluss nahelegten, daß diese Kriterien selbst bei weitreichenden Verbesserungen der Reaktionsbedingungen nicht zu erfüllen waren, wurde die Phosphoramidit-Methode nicht weiter verfolgt.

#### **4.1.2 Umsetzungen freier 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate mit einfachen Aminen**

Alle bisher in der Literatur beschriebenen Verfahren der Fluoreszenzmarkierung von freien Nukleotiden beruhen auf einer Derivatisierung der Phosphatgruppe am 5'-Ende des Riboserestes durch ein Amin unter Ausbildung eines Phosphoramidats. Diese Verfahren basieren im Prinzip auf der von *Chu et al.* 1983 vorgestellten Methode der Derivatisierung von ungeschützten 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphaten in Wasser [155]. Dabei werden die Nukleotide mit einem wasserlöslichen Carbodiimid in einem Imidazol-Puffer zu 5'-Phosphorimidazoliden umgesetzt. Die erzielten Ausbeuten betragen in diesem Fall ca. 75%. Diese intermediär gebildeten Imidazolide reagieren dann in Anwesenheit von Aminen quantitativ zu stabilen Phosphoramidaten (siehe Abbildung 45).

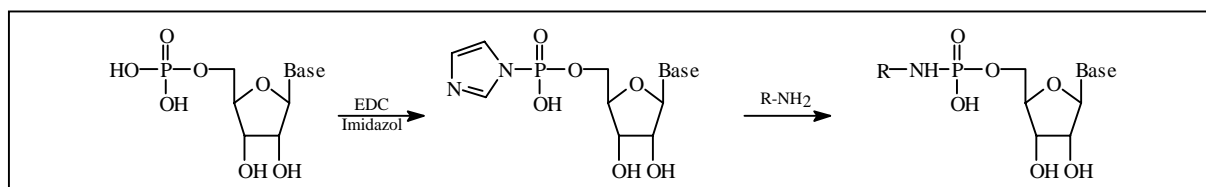


Abb. 45: Derivatisierung ungeschützter Nukleosid-5'-Phosphate nach *Chu et al.*; Base = Adenin, Cytosin; Guanin; Thymin; R =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

Basierend auf dieser Synthesestrategie stellte *Kelman et al.* 1988 eine Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxy-mononukleotiden aus enzymatischem DNA-Verdau in zwei Reaktionsschritten vor [156]. Dabei wurden die intermediär gebildeten Phosphorimidazolide durch Umsetzung mit Ethylendiamin in 5'-Ethylendiamin-phosphoramidate überführt. Letztere präsentieren nun eine einfach zu derivatisierende primäre, aliphatische Aminogruppe, über die durch Reaktion mit Dansylchlorid die Fluoreszenzmarkierung ermöglicht wird. Analog gelingt auch die Konjugation der 5'-Ethylendiamin-phosphoramidate mit anderen Amin-reaktiven Fluoreszenzmarkern wie zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat [157].

Durch die Verwendung eines an Imidazol gekoppelten Fluorophors gelang *Wang und Giese* 1993 die Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphaten [158] entsprechend der oben aufgeführten Darstellung von 5'-Phosphorimidazoliden in einer Ein-Schritt-Reaktion. Allerdings führt die Verwendung eines substituierten Imidazols zu Gemischen unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Spezies aufgrund der gleichermaßen möglichen Kopplung über N1 oder N3 des Imidazolringes [159] (Abbildung 46). Die Arbeitsgruppe von *Roger W. Giese* stellte bis dato diese Strategie mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren – BODIPY [158,159,166] und 4-(N,N-Dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazol [167] – vor. Allerdings wurde im Gegensatz zu den Arbeiten von *Kelman et al.* keine DNA-Hydrolysate eingesetzt [156], sondern reine 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphate beziehungsweise Mischungen verschiedener Nukleotide.

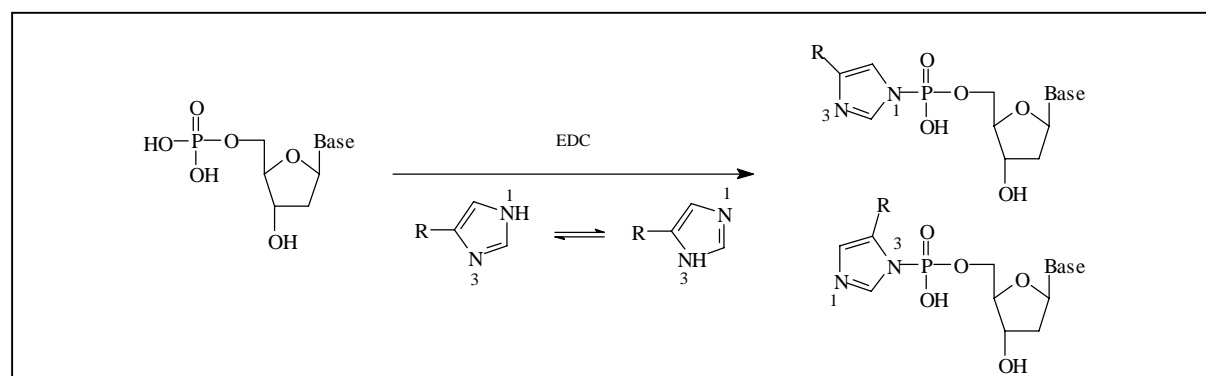


Abb. 46: Direkte Fluoreszenzderivatisierung von 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphaten nach *Wang und Giese*; Base = Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin; R = Fluorophor

Diese in der Literatur beschriebenen Verfahren haben allerdings deutliche Nachteile. So wurden sie nur für Nukleosid-5'-phosphate gezeigt, während aufgrund des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahrens die enzymatische Hydrolyse addukturierter DNA zu 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphaten Stand der Technik ist. Neben dem Nachteil einer Zwei-Stufen-Reaktion birgt die Umsetzung eines Amin-reaktiven Fluoreszenzmarkers mit Ethylendiamin-konjugierten Nukleotiden die Gefahr der Markierung der exozyklischen Aminogruppen von Adenin, Cytosin und Guanin. Diese Mehrfachmarkierungen legten bereits bei der Phosphoramidit-Technik den Schluß nahe, daß das Derivatisierungsmuster sehr komplex und somit nur schwer zu interpretieren ist. Die direkte Derivatisierung mit einem fluoreszenten Imidazol-Derivat umgeht dieses Risiko, allerdings mit dem Nachteil regioisomerer Spezies. Desweiteren könnten bislang nicht gelöste Matrix-Probleme der Grund für eine bisher nicht gezeigte Derivatisierung der DNA-Hydrolysate nach der Methode von *Giese et al.*[158] sein.

Somit ergab sich die Aufgabe, basierend auf den vorgestellten Strategien, eine Methode der direkten Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten nach enzymatischer DNA-Hydrolyse zu entwickeln. Dazu wurden zunächst die für 5'-Phosphate beschriebenen Methoden zur Konjugation einfacher Amine auf 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate übertragen. Die dabei ermittelten Bedingungen sollten auf eine direkte Markierung durch einen Fluoreszenzmarker mit einem primären Amin als Ankergruppe übertragen werden. Abschließend sollte diese Derivatisierungsmethode an die Verhältnisse der enzymatischen DNA-Hydrolyse angepasst werden.

#### **4.1.2.1 Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphorimidazoliden**

Die erste bekannte Umsetzung ungeschützter Nukleotide mit einfachen Aminen von *Chu et al.* [155] erfolgte durch Inkubation einer 1mM wäßrigen Nukleosid-5'-Phosphat-Lösung in 100mM Imidazol-Puffer bei pH = 6 unter Aktivierung mit 100mM wäßriger EDC-Lösung. Innerhalb einer Stunde konnte eine Reaktionsausbeute von 75% an Nukleosid-5'-phosphorimidazolid erzielt werden. *Al-Deen et al.* [157] erzielten quantitative Umsetzungen, in dem sie die Nukleotide anstatt in Wasser in Dimethylsulfoxid (DMSO) lösten und mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Imidazol in methanolischer Lösung umsetzen. Die dabei verwendeten Konzentrationen an Aktivator und Imidazol waren jeweils 1M.

Aufgrund der besseren Ausbeuten und der höheren Hydrolysestabilität des Aktivators durch den Einsatz von DMSO als Lösungsmittel wurden die ersten Versuche, diese Methode auf 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate zu übertragen, entsprechend der Umsetzungen nach *Al-Deen*



*et al.* durchgeführt. Es wurden je 1mg Mononukleotid in 20µl DMSO gelöst und mit 300µl einer jeweils 1M methanolischen Imidazol/DCC-Lösung 1 Stunde lang inkubiert. Nach Lyophilisierung der Reaktionslösung wurde der Rückstand in jeweils 1ml Wasser aufgenommen. Dabei entstand ein Niederschlag an wasserunlöslichem, nicht umgesetzten DCC. Dieser Niederschlag wurde durch Filtration abgetrennt. In den Lösungen konnte durch ESI-Massenspektrometrie die Phosphorimidazole aller vier Nukleotide **34-37** (Abbildung 47) nachgewiesen werden.

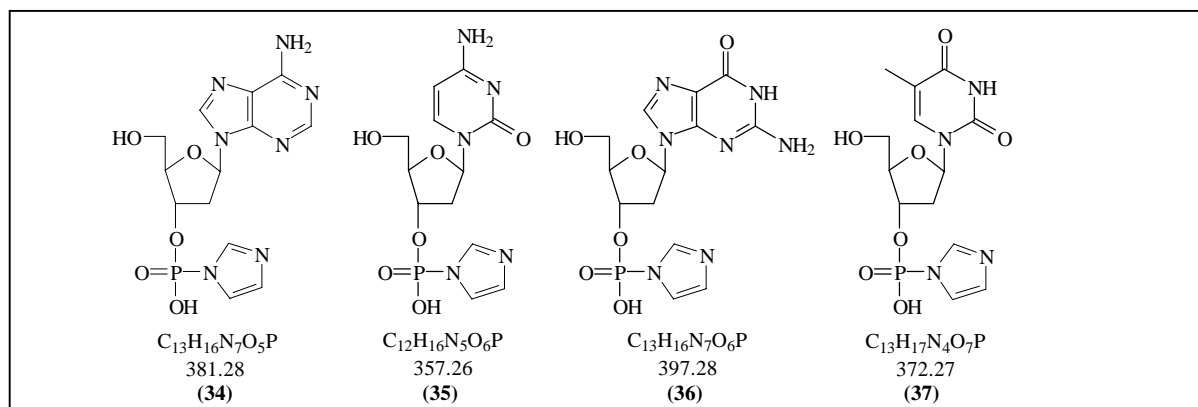


Abb. 47: Dargestellte 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphorimidazole; **34** = 2'-Desoxyadenosin-3'-phosphorimidazolid; **35** = 2'-Desoxycytidin-3'-phosphorimidazolid, **36** = 2'-Desoxyguanosin-3'-phosphorimidazolid; **37** = 2'-Desoxythymidin-3'-phosphorimidazolid

Abbildung 48 zeigt exemplarisch das –Q1-ESI-Massenspektrum des 2'-Desoxycytosin-3'-phosphorimidazols **35**, erhalten durch Umsetzung von 3'-dC **23** mit Imidazol unter DCC-Aktivierung in DMSO. Das Massenspektrum zeigt, daß unter den aufgeführten Reaktionsbedingungen das freie 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphat **23** fast vollständig zu dem entsprechenden 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphorimidazolid **35** umgesetzt wurde. Entsprechende Ergebnisse konnten für alle Nukleotide erzielt werden. In allen Umsetzungen wurden Signale der Massen  $m/z \sim 414$  und  $m/z \sim 620$  beobachtet, die nicht identifiziert wurden. Flüssigkeitschromatographische Aufarbeitungen der Reaktionsansätze führten stets zur Hydrolyse der gebildeten Verbindungen. *Chu et al.* [155] beschrieben bereits, daß die Phosphorimidazole bei Anwesenheit von Säurespuren in wäßrigen Medien innerhalb von drei Stunden komplett zu den freien Nukleosid-3'-phosphaten hydrolysieren. Somit konnte im Rahmen dieser ersten Experimente gezeigt werden, daß die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Derivatisierung von Nukleosid-5'-phosphaten prinzipiell auf 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate übertragbar sein sollten.

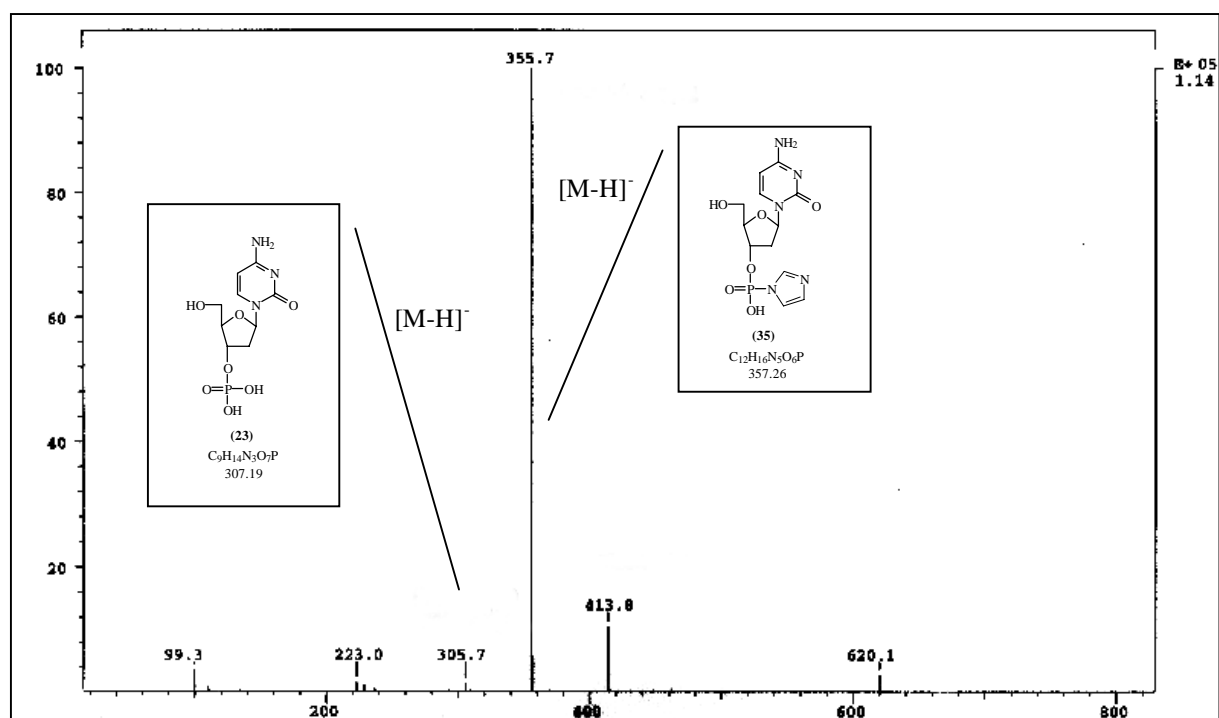


Abb. 48: -Q1-ESI-Massenspektrum der Reaktionslösung der Umsetzung von 3'-dC **23** mit Imidazol unter DCC-Aktivierung in DMSO.

#### 4.1.2.2 Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-3'-ethylendiamin-phosphoramidaten

Die unter Abschnitt 2.3.2 und 4.1.2 beschriebenen Methoden zur Fluoreszenzderivatisierung von Nukleotiden gehen gleichermaßen von 2'-Desoxymononukleosid-5'-ethylendiamin-phosphoramidaten aus. Diese wurden durch Umsetzung der 5'-Phosphorimidazole mit Ethylendiamin bei einem pH-Wert von 7,5 erhalten. Auch dieser Syntheseweg wurde auf seine Anwendbarkeit für 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate überprüft. Dabei wurde entsprechend der Darstellung der Phosphorimidazole **34–37** (Abschnitt 4.1.2.1) vorgegangen. Es wurden jeweils 1mg Mononukleotid in 20µl DMSO gelöst und mit 300µl einer jeweils 1M methanolischen Imidazol/DCC-Lösung 1 Stunde lang inkubiert. Die dabei gebildeten Phosphorimidazole wurden durch Umsetzung dieser Reaktionslösung mit 0,63M methanolischer Ethylendiamin-Lösung innerhalb von vier Stunden vollständig in die Ethylendiamin-phosphoramidate **38–41** (Abbildung 49) überführt. Wichtig dabei ist, die methanolische Ethylendiamin-Lösung durch verdünnte Salzsäure auf einen pH = 7,5 einzustellen, um eine ausreichende Nukleophilie der Amingruppen (pK<sub>s</sub> der zweiten Protolysestufe = 7,5 [168]) zu gewährleisten, ohne durch zu saure Bedingungen eine vorzeitige Hydrolyse der Phosphoramidat-Kopplung [155] zu riskieren. Aufgrund der größeren Hydrolysestabilität der Ethylendiaminkonjugate gegenüber den Imidazol-

Konjugaten [155] konnten die Verbindungen **38–41** flüssigkeitschromatographisch aus der Reaktionslösung isoliert werden. Dazu wurde die Reaktionslösung lyophilisiert und in 1ml Wasser aufgenommen. Der dabei gebildete Niederschlag von nicht umgesetztem DCC wurde durch Filtration abgetrennt und die Phosphoramidate mittels RP-HPLC isoliert. Die erzielten Ausbeuten betrugen zwischen 75 bis 90%.

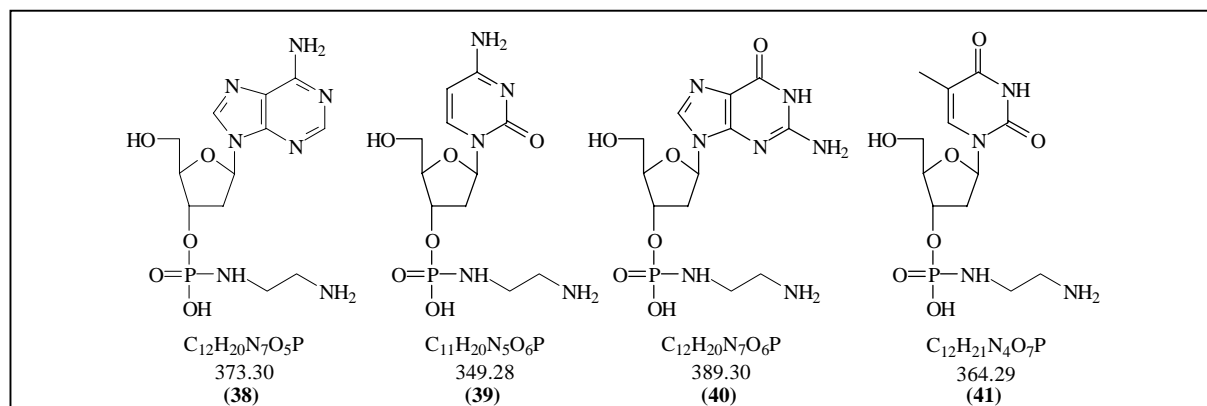


Abb. 49: Dargestellte 2'-Desoxynukleosid-3'-ethylendiamin-phosphoramidate; **38** = 2'-Desoxyadenosin-3'-ethylendiamin-phosphoramidat; **39** = 2'-Desoxycytidin-3'-ethylendiamin-phosphoramidat, **40** = 2'-Desoxyguanosin-3'-ethylendiamin-phosphoramidat; **41** = 2'-Desoxythymidin-3'-ethylendiamin-phosphoramidat

Abbildung 50 zeigt exemplarisch das Massenspektrum des isolierten 2'-Desoxyadenosin-3'-ethylendiamin-phosphoramidates **38**.

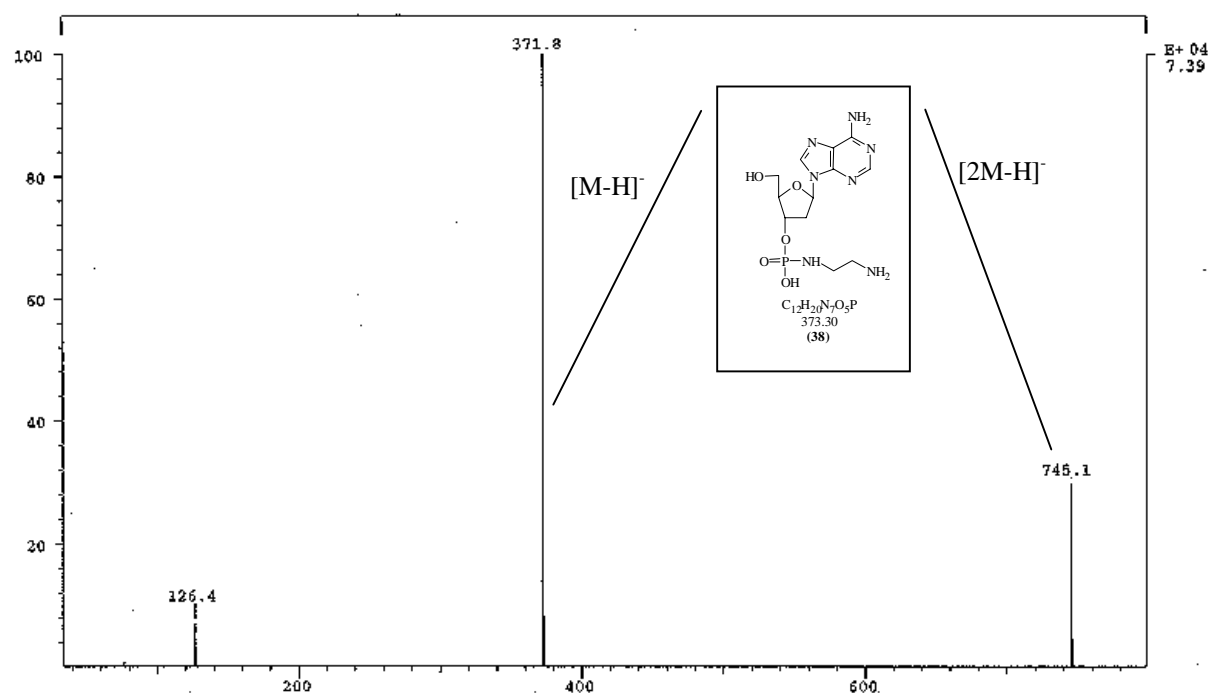


Abb. 50: -Q1-ESI-Massenspektren von 2'-Desoxyadenosin-3'-ethylendiamin-phosphoramidat **38**

#### 4.1.2.3 Diskussion

Die unter Abschnitt 4.1.2.1 und 4.1.2.2 vorgestellten Umsetzungen von Nukleotiden mit einfachen Aminen zeigten, daß die von *Chu et al.* beschriebenen Derivatisierungen freier 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphate [155] auf freie 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate übertragbar sind. Somit eröffnet sich prinzipiell die Möglichkeit, Mononukleotide aus enzymatischer DNA-Hydrolyse nach den von *Kelman et al.* und *Al-Deen et al.* beschriebenen Methoden [156,157] mit Fluoreszenzmarkern zu konjugieren. Diese Methoden basieren auf der Derivatisierung der Mononukleotide durch Ethylendiamin unter Bildung von Nukleotid-ethylendiamin-phosphoramidaten. Die auf diese Weise generierte primäre Aminofunktion an der Phosphatgruppe wird ausgenutzt, um in einem weiteren Reaktionsschritt Amin-reaktive Fluoreszenzmarker wie zum Beispiel Dansylchlorid oder Fluoresceinisothiocyanat an die Mononukleotide zu koppeln (Abschnitt 2.3.2). Da bei der Umsetzung Amin-reaktiver Fluoreszenzmarker mit Mononukleotiden allerdings auch die exocyclischen Amingruppen der Basen Adenin, Cytosin und Guanin derivatisierbar sein sollten, birgt diese Vorgehensweise ebenso wie die unter 4.1.1.2 vorgestellte Fluoreszenzmarkierung mittels der Phosphoramidit-Methode die Gefahr der Mehrfachmarkierungen. Verbunden mit der Tatsache, daß DNA-Addukte *in vivo* nur in sehr geringen Mengen vorkommen, entstehen durch diese Mehrfachmarkierungen sehr komplexe Produktgemische, die die Interpretation der nachfolgenden kapillarelektrophoretischen Trennungen erschweren. Ferner werden zur Markierung der Nukleotide nach *Kelman et al.* zwei Reaktionsschritte benötigt [156], wobei sich das Risiko sowohl der artifiziellen Änderungen des Adduktumusters als auch geringer Gesamtkopplungsausbeuten bezogen auf die Nukleotide erhöht. *Wang* und *Giese* umgehen dies, indem sie Fluoreszenzmarker verwenden, der an N-acetyl-L-histidin gebunden ist. Die Ankopplung an 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphate erfolgt über den Imidazol-Ring des Aminosäurederivates entsprechend der Methodik von *Chu et al.* in einer Ein-Schritt-Reaktion in wäßrigem Medium mit EDC als aktivierendes Agens [158,159,166,167]. Sie konnten zeigen, daß diese Form der Reaktionsführung ausschließlich zur Derivatisierung von Phosphatgruppen führte und keine Mehrfachmarkierungen stattfanden. Die Konjugation eines Fluoreszenz-markers über ein Imidazolid hat allerdings entscheidende Nachteile. So werden isomere N1- und N3-Konjugate gebildet (Abbildung 46) und die gebildeten Imidazolide sind im Vergleich zu Ethylendiamin-phosphoramidaten weniger hydrolysestabil [155]. Ein weiterer Nachteil dieser Vorgehensweise liegt darin, daß sich im Falle von Wasser als Lösungsmittel, wie es für Umsetzungen von Mononukleotiden aus der enzymatischen DNA-

Hydrolyse notwendig ist, die Ausbeuten der Imidazol-Kopplung deutlich [158] reduzieren (< 50%).

Es konnte gezeigt werden, daß sich unter bestimmten Voraussetzungen einfache Amine effizient an freie 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate ankoppeln lassen. Dabei ist die Wahl des pH-Wertes, des Reaktionsmediums sowie des aktivierenden Carbodiimids von entscheidender Bedeutung für die Ausbeute der Reaktion und die Stabilität der gebildeten Phosphoramidate. Allerdings erweist sich die Übertragung der Konzepte zur Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphaten auf 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate aus enzymatischer DNA-Hydrolyse zur DNA-Addukt-Analytik aufgrund der genannten Nachteile als nicht geeignet.

#### 4.1.3 Entwicklung einer Fluoreszenzderivatisierung von Mononukleotiden mittels Phosphoramidat-Methode

Die Ergebnisse der Carbodiimid-aktivierten Umsetzungen einfacher Amine mit 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten führten zu der Überlegung, daß für eine Derivatisierung der Mononukleotide aus enzymatischer DNA-Hydrolyse Fluoreszenzmarker, die über ein primäres Amin als Ankergruppe verfügen, besonders geeignet sein sollten. Diese Vorgehensweise würde die Durchführung der Markierung in einem einzigen Reaktionsschritt unter der Bildung definierter und stabiler Phosphoramidate ermöglichen. Da Carbodiimide außer Phosphatgruppen insbesondere Carboxylgruppen effektiv aktivieren können [169], muß gewährleistet sein, daß der Fluoreszenzmarker über keine Carbonsäure-Funktion verfügt, um Eigenkondensationen zu vermeiden. Somit erweisen sich Derivatisierungen mit klassischen Fluoreszenzmarkern wie Fluorescein- oder Rhodaminderivaten als ungeeignet. Ein Fluoreszenzmarker, der diese Bedingungen erfüllt, ist das in Abbildung 51 dargestellte 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylendiaminhydrochlorid („BODIPY-EDA“, **42**) der Firma Molecular Probes (Eugene, Oregon USA) [123].

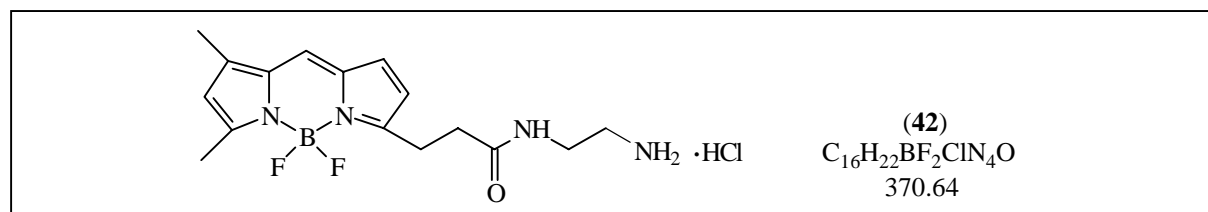


Abb. 51: 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylendiaminhydrochlorid („BODIPY-EDA“ **42**) von Molecular Probes (Eugene, Oregon USA)

Dieser Fluoreszenzmarker besitzt mit einem Extinktionsmaximum bei 503nm und einem Emissionsmaximum bei 510nm [123] geeignete spektroskopische Eigenschaften zur Anregung mit Argon-Ionen-Lasern mit einer Emissionswellenlänge von 488nm. Darüber hinaus verfügt diese Verbindung trotz des Fehlens von Carbonsäuregruppen über eine ausreichende Wasserlöslichkeit [123]. Von besonderer Bedeutung ist, daß die Ankergruppe als Analogon zu Ethylendiamin aufgefasst werden kann, was eine Übertragung der unter Abschnitt 4.1.2.1 aufgeführten Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-3'-ethylendiamin-phosphoramidaten auf die Verhältnisse des enzymatischen DNA-Hydrolysates ermöglichen sollte. Im Gegensatz zu den Histidin-konjugierten Fluoreszenzmarkern [158,167] sollte die Bildung regioisomerer Kopplungsprodukte durch eine primäre Aminofunktion als Ankergruppe sicher vermieden werden.

Der pH-Wert der Reaktionslösung ist für die effektive Kopplung eines Amins an eine Phosphatgruppe unter Ausbildung eines Phosphoramidates von besonderer Bedeutung. Nur eine ausreichende Deprotonierung des Amins gewährleistet eine hohe Nukleophilie. Aus diesem Grund werden Carbodiimid-aktivierte Amin-Konjugationen sinnvollerweise bei pH-Werten durchgeführt, die den  $pK_s$ -Werten der eingesetzten Amine entsprechen [170], da zu basische Bedingungen zu einer schnellen Hydrolyse des Carbodiimids führen. Carbodiimid-induzierte Reaktionen sind aufgrund unterschiedlich aktiver tautomerer Formen stark pH-abhängig [171,172]. Abbildung 52 zeigt eine Darstellung der unterschiedlichen pH-abhängigen Tautomere des wasserlöslichen Carbodiimids EDC [170].

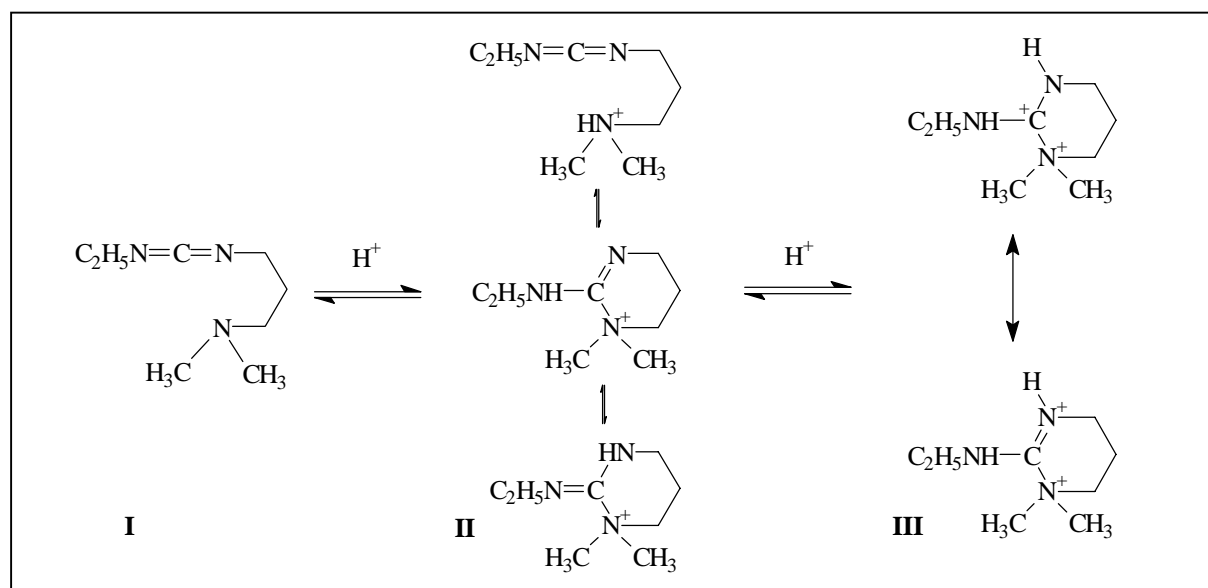


Abb 52: Darstellung der verschiedenen EDC-Tautomere in Abhängigkeit des pH-Wertes [170]

*Ivanovskaya et al.* beobachteten, daß EDC-aktivierte Umsetzungen verschiedener Amine unterschiedlicher Basizität bei pH-Werten von 3 bis 5 am effektivsten ablaufen [170]. Dabei liegt EDC vermutlich überwiegend in seiner aktivsten Form III (siehe Abbildung 52) vor. Andererseits nimmt die Halbwertszeit von freiem EDC in Wasser von 12h bei pH = 7,0 drastisch auf 0,32h bei pH = 5,0 ab [172], was sich besonders bei längeren Reaktionszeiten nachteilig auswirkt. Verantwortlich dafür ist die sauer katalysierte Hydrolyse des Carbodiimids zum entsprechenden Harnstoffderivat [172]. Trotz der höheren Aktivität unter sauren Bedingungen ermöglicht EDC dennoch die Aktivierung insbesondere von Phosphorsäuremonoestern bei pH-Werten > 6 [170]. Verantwortlich dafür ist die stark basische tertiäre Aminogruppe ( $pK_s = 11,1$  [170]), die im neutralen Bereich stets protoniert vorliegt. Dadurch kann EDC durch intramolekularen Protonentransfer vom tertiären Stickstoffatom zum Imin-Stickstoffatom aktiviert werden und entsprechend nachfolgendem Schema den nukleophilen Phosphorsäuremonoester-Angriff einleiten [170,171].

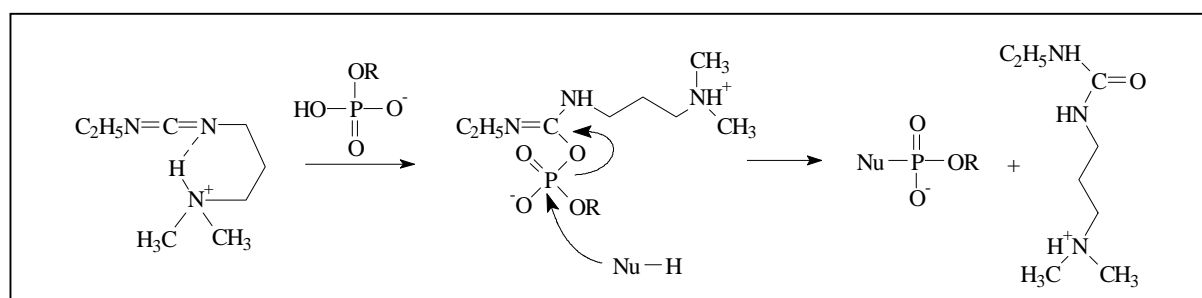


Abb. 53: Darstellung EDC-vermittelter nukleophiler Phosphorsäuremonoester-Modifikationen; Nu = Nukleophil

Somit liegt die Annahme nahe, daß EDC-vermittelte Reaktionen zwischen 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten und einem Fluoreszenzmarker mit einer primären Aminofunktion als Ankergruppe idealerweise in einem pH-Bereich von 5 bis 7 ablaufen sollten. Um die gewünschte Kopplung des Markers an das Nukleotid zu gewährleisten, muß sichergestellt sein, daß die Reaktionslösung und insbesondere die verwendeten Puffersubstanzen frei von Amino-, Phosphat- und Carbonsäuregruppen sind. So nimmt die Zerfallskonstante von freiem EDC in Wasser in Anwesenheit von anorganischem Phosphat dramatisch zu [172]. EDC wird bei pH = 7,0 durch Zugabe von 10mM Phosphat 10mal schneller zum inaktiven Harnstoffderivat hydrolysiert als in Phosphat-freier Lösung gleichen pH-Wertes. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß die Inaktivierung von freiem EDC in Anwesenheit von Phosphat nicht nur säurekatalytisch, sondern zusätzlich durch Hydrolyse intermediär gebildeter O-Phosphat-isoharnstoffe abläuft. Als Phosphat-, Carbonsäure- und Amin-freie Puffersubstanzen stehen somit lediglich 2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure

(MES) und *N*-(2-hydroxyethyl)piperazin-*N'*-2-ethansulfon-säure (HEPES) für den gewünschten pH-Bereich zur Verfügung.

Unter Berücksichtigung dieser Vorüberlegungen sollte eine effiziente Derivatisierung der freien 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate mit BODIPY-EDA in wässrigem Medium entwickelt werden und auf die Verhältnisse der enzymatischen DNA-Hydrolyse übertragen werden. Nachdem in Abschnitt 4.1.2 gezeigt werden konnte, daß Reaktionen einfacher Amine mit Nukleosid-5'-phosphaten auf Nukleosid-3'-phosphate übertragen werden können, wurden die Derivatisierungsbedingungen aus Kostengründen mit 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat als Modellschubstanz entwickelt. Darüber hinaus wurde ebenfalls aus Kostengründen Glycinethylester aufgrund seiner Ähnlichkeit mit der Ankergruppe des ausgewählten Fluoreszenzmarkers BODIPY-EDA als Analogon eingesetzt.

#### 4.1.3.1 Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-5'-glycinethylester-phosphoramidaten

Anhand der Umsetzung von 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat (5'-dA, **43**) mit Glycinethylester (GLY, **44**) unter Carbodiimid-Aktivierung in wässrigem Medium (Abbildung 54) wurde modellhaft untersucht, unter welchen Reaktionsbedingungen 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate aus enzymatischer DNA-Hydrolyse effizient mit einem Fluoreszenzmarker, der über eine primäre Aminfunktion als Ankergruppe verfügt, derivatisiert werden können. Einerseits bietet sich Glycinethylester aufgrund seiner Ähnlichkeit mit der Ankergruppe des Fluoreszenzmarkers der Wahl, BODIPY-EDA, an. Andererseits sind Glycinethylester-Kopplungen an 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphate [170] als auch an das 3'-Phosphat-Ende von Oligonukleotiden [173] in der Literatur beschrieben worden.

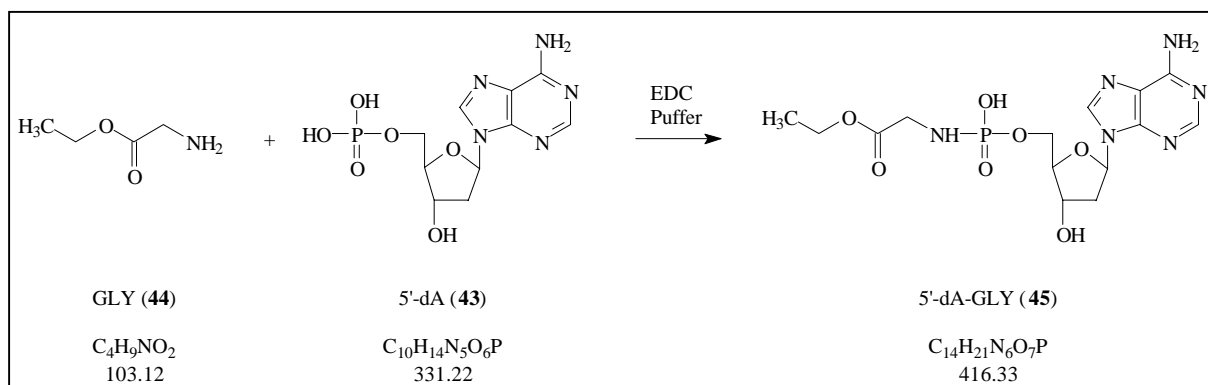


Abb. 54: Darstellung von 2'-Desoxyadenosin-5'-glycinethylester-phosphoramidat (5'-dA-GLY, **45**).

Zur Kontrolle der einzelnen Umsetzungen wurden jeweils zu definierten Zeitpunkten Proben der Reaktionslösung entnommen und kapillarelektrophoretisch untersucht. Dabei wurden die



Trennungen in einer nicht-oberflächenbehandelten Kapillare (Länge = 50cm, Durchmesser = 50µm, Trennspannung = 400V/cm, kathodisches outlet) mit 20mM Natriumborat-Puffer, pH = 9,3 durchgeführt (siehe Abbildung 55).

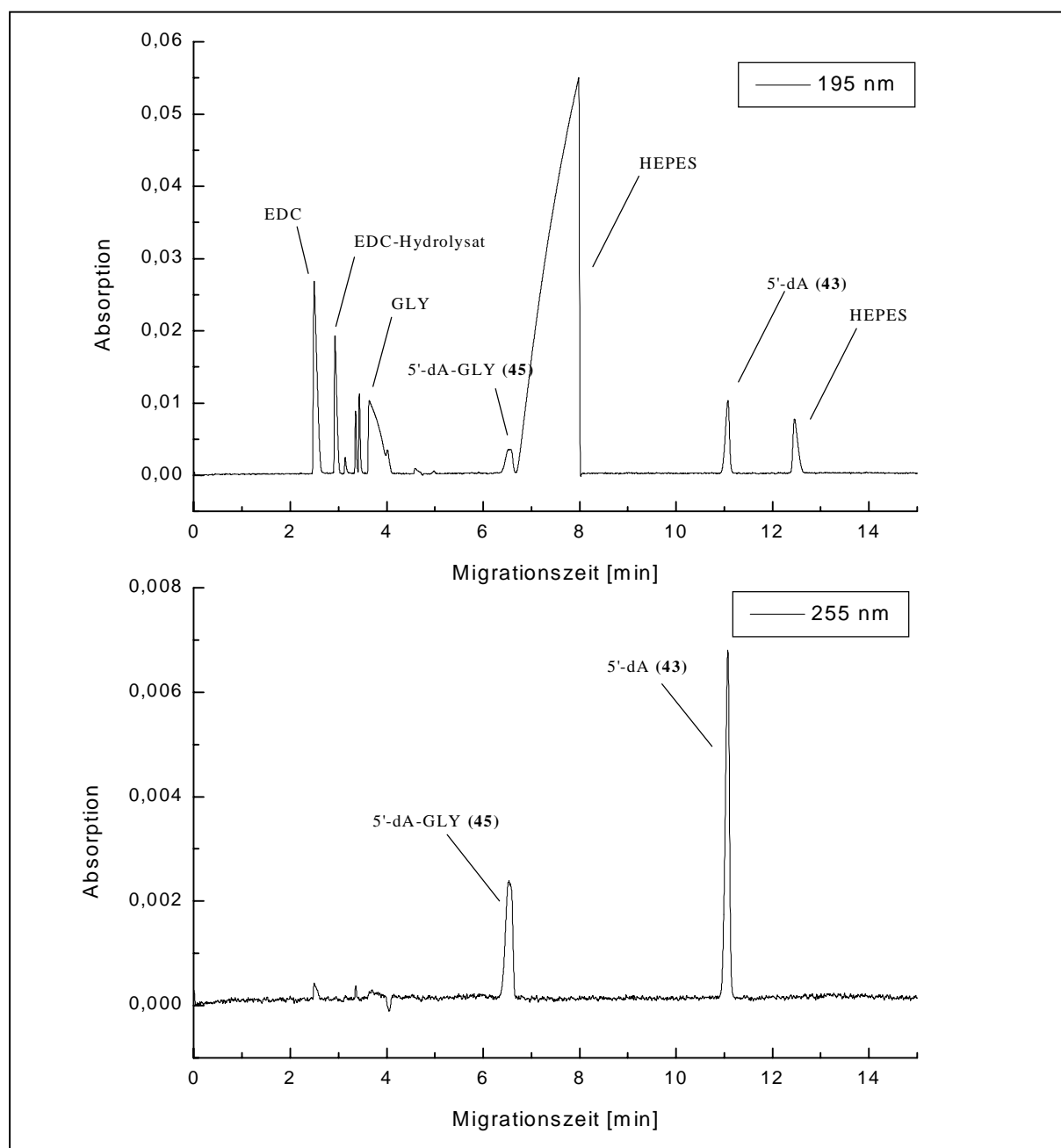


Abb. 55: Elektropherogramm einer Umsetzung von 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat (5'-dA) mit Glycinethylester (GLY) unter EDC-Aktivierung in HEPES-Puffer bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (195 und 255nm).

Die Detektion der Reaktanden erfolgte mittels schnell-scannender UV-Detektion bei Wellenlängen von 195 bis 350 nm in 5nm-Schritten. Die Identität der Reaktanden wurde sowohl durch Aufstocken der Reaktionslösung mit Standards als auch anhand der erhaltenen

UV-Spektren der einzelnen Signale ermittelt. Die abgebildeten Elektropherogramme in Abbildung 54 verdeutlichen, daß sich kapillarelektrophoretische Trennungen sehr gut zur Reaktionskontrolle der Glycinkonjugation eignen. So erkennt man bei 195nm alle wichtigen Bestandteile der Reaktionslösung wie zum Beispiel frisches EDC, inaktives EDC-Hydrolysat, nicht umgesetzten Glycinethylester und Nukleotid sowie bereits gebildetes Glycinethylester-Adenosin-Konjugat **45**. Zur Bestimmung der Reaktionsausbeute wurde das Verhältnis der Integrale aus 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat **43** und 2'-Desoxyadenosin-5'-glycinethylester-phosphoramidat **45** bei 255nm herangezogen. Diese Detektionswellenlänge ermöglicht trotz der Nähe des Signals von 5'-dA-GLY zu dem Hauptsignal des HEPES-Puffers eine exakte Quantifizierung des gebildeten Konjugats aufgrund des Umstandes, daß von allen Reaktionsbestandteilen ausschließlich Nukleobasen in diesem spektralen Bereich eine UV-Aktivität besitzen. Anhand dieser Möglichkeit der Reaktionskontrolle sollte der Einfluß des verwendeten Puffers, des pH-Wertes der Reaktionslösung, der stöchiometrischen Verhältnisse der Reaktanden sowie der Reaktionstemperatur und -dauer auf die erzielten Ausbeuten an 2'-Desoxyadenosin-5'-glycinethylester-phosphoramidat untersucht werden.

#### *a) Ermittlung der geeigneten Puffersubstanz und des geeigneten pH-Wertes*

Ausgehend von der von *Ivanovskaya et al.* [170] beschriebenen Methode zur Umsetzung von 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphaten mit Aminen unter EDC-Aktivierung wurde 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat mit Glycinethylester unter Zugabe von EDC zur Reaktion gebracht. Dabei wurden jeweils gleiche Volumina 1mM Nukleotid-, 50mM Aktivator- und 300mM Aminlösung in jeweils 10mM HEPES- oder MES-Puffer, eingestellt auf einen pH-Wert = 6,5, bei Raumtemperatur umgesetzt. HEPES und MES erfüllen gleichermaßen die unter Abschnitt 4.1.3 aufgeführten Vorbedingungen zur Bildung von Phosphoramidaten. Die kapillarelektrophoretische Untersuchung beider Reaktionslösungen ergab im Falle von HEPES als Puffersubstanz eine zumindest teilweise Konjugation des Glycinethylesters an das Nukleotid, während die Umsetzungen in MES-Puffer fehlschlagen. Die Erhöhung der Pufferkonzentration auf 100mM führte im Falle von HEPES zu einer deutlich effektiveren Umsetzung der Reaktanden innerhalb von 24h, während auch in diesem Fall Umsetzungen mit MES als Puffersubstanz erfolglos blieben. Höhere Pufferkonzentrationen bis hin zu 500mM Lösungen zeigten allerdings keine signifikante Verbesserung der Reaktionsausbeute. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Untersuchungen nur noch mit 100mM HEPES als Pufferlösung durchgeführt. Zur Ermittlung des optimalen pH-Bereiches der Glycinethylester-Konjugation wurde der pH-Wert des 100mM HEPES-Puffer in Schritten von jeweils 0,3 pH-

Einheiten von pH = 6,0 bis 7,2 variiert. Dabei ergab sich, daß die Reaktionen bei pH = 6,3 und 6,6 am erfolgreichsten verliefen, während bei pH = 6,0 keine Umsetzungen stattfanden. Reaktionen bei pH = 6,9 und 7,2 verliefen prinzipiell erfolgreich, lieferten allerdings deutlich schlechtere Kopplungsausbeuten.

Diese Optimierungen der Puffersubstanz bezüglich ihres Konzentrations- und pH-Bereiches führten zu der Entscheidung, alle weiteren Untersuchungen in 100mM HEPES-Lösungen, pH = 6,5 durchzuführen, da dieser im Vergleich zu einem pH-Wert von 6,3 eine höhere Pufferkapazität des verwendeten HEPES gewährleistet [118]. Die Übertragbarkeit der durch die Umsetzung von 5'-dA erzielten Ergebnisse auf andere Nukleotide zeigt Tabelle 3 anhand der kapillarelektrophoretisch bestimmten Kopplungsausbeuten aller acht Nukleotide mit Glycinethylester unter den oben genannten Reaktionsbedingungen nach 36h Reaktionsdauer.

Nukleotid	5'-GLY-Phosphoramidat	3'-GLY-Phosphoramidat
Adenosin	91%	56%
Cytidin	76%	45%
Guanosin	91%	66%
Thymidin	66%	55%

Tab. 3: Vergleich der Kopplungsausbeuten der Umsetzung von 2'-Desoxynukleosid-5'- und -3'-phosphaten mit Glycinethylester unter EDC-Aktivierung

Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, daß entsprechend der Resultate in Abschnitt 4.1.2 Derivatisierungsstrategien für 5'-Phosphate auf die entsprechenden 3'-Phosphate übertragbar sind. Allerdings bestehen unter den gewählten Reaktionsbedingungen zwischen den einzelnen Nukleotiden deutliche Ausbeuteunterschiede. Wang und Giese beschreiben ebenfalls entsprechende Ausbeuteunterschiede für die Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphate [158]. Die Ausbeuten in Tabelle 3 verdeutlichen ferner, daß 3'-Phosphate nicht so effizient umzusetzen sind wie 5'-Phosphate. Dies ist wahrscheinlich auf die sterisch anspruchsvollere 3'-Position der Desoxyribose zurückzuführen.

#### *b) Einfluß der stöchiometrischen Verhältnisse, der Reaktionstemperatur und der Reaktionsdauer*

Von entscheidender Bedeutung für die zu entwickelnde Derivatisierungsmethode zur Fluoreszenzmarkierung enzymatisch hydrolysierter DNA waren folgende Punkte:

- Die Fluoreszenzmarkierung muß aufgrund der geringen Konzentration der DNA-Addukte *in vivo* hocheffizient sein.
- Um artifizielle Veränderungen des DNA-Hydrolysats hinsichtlich seines Adduktusters zu vermeiden, muß die Derivatisierung unter schonenden Bedingungen ablaufen.
- Um störende Nebensignale durch den Fluoreszenzmarker und möglicher Abbauprodukte gering zu halten sowie bedingt durch seinen hohen Preis sollte die einzusetzende Menge möglichst gering gehalten werden.

Deshalb wurde anhand der Kopplung von Glycinethylester an 5'-dA modellhaft untersucht, wie sich eine effiziente Umsetzung des Nukleotids durch Variation der Stöchiometrie und der Reaktionstemperatur in kurzer Reaktionszeit mit möglichst geringen Mengen an Glycinethylester als Surrogat für den Fluoreszenzmarker erzielen läßt.

Um den Einfluß der Reaktionstemperatur zu untersuchen, wurden jeweils 300µl einer wäßrigen 1mM 5'-dA-Lösung, einer 50mM EDC-Lösung und einer 300mM GLY-Lösung in jeweils 100mM HEPES, pH = 6,5, bei 4°C, 25°C und 50°C zur Reaktion gebracht. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden jeweils 10µl der Reaktionslösung entnommen und unter den oben erwähnten kapillarelektrophoretischen Bedingungen das Verhältnis aus Konjugat zu 5'-dA bestimmt. Dabei ergaben die kapillarelektrophoretischen Trennungen, daß bei einer Reaktionstemperatur von 50°C freies EDC bereits innerhalb eines Zeitraumes von zwei Stunden komplett zum entsprechenden Harnstoff-Derivat hydrolysiert wurde und somit kein 5'-dA-GLY-Konjugat gebildet werden konnte. Die erzielten Umsetzungsraten bei 4°C und 25°C sind in Abbildung 56 dargestellt. Während Umsetzungen bei einer Reaktionstemperatur von 25°C bereits nach 35h einen Kopplungsgrad von ca. 90% aufweisen, verläuft die gleiche Derivatisierung bei 4°C deutlich langsamer. So wird selbst nach 50h erst ein Kopplungsgrad von ca. 60% erreicht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die folgenden Optimierungen dieser Reaktion jeweils Umsetzungen bei 25°C und 35°C miteinander verglichen.

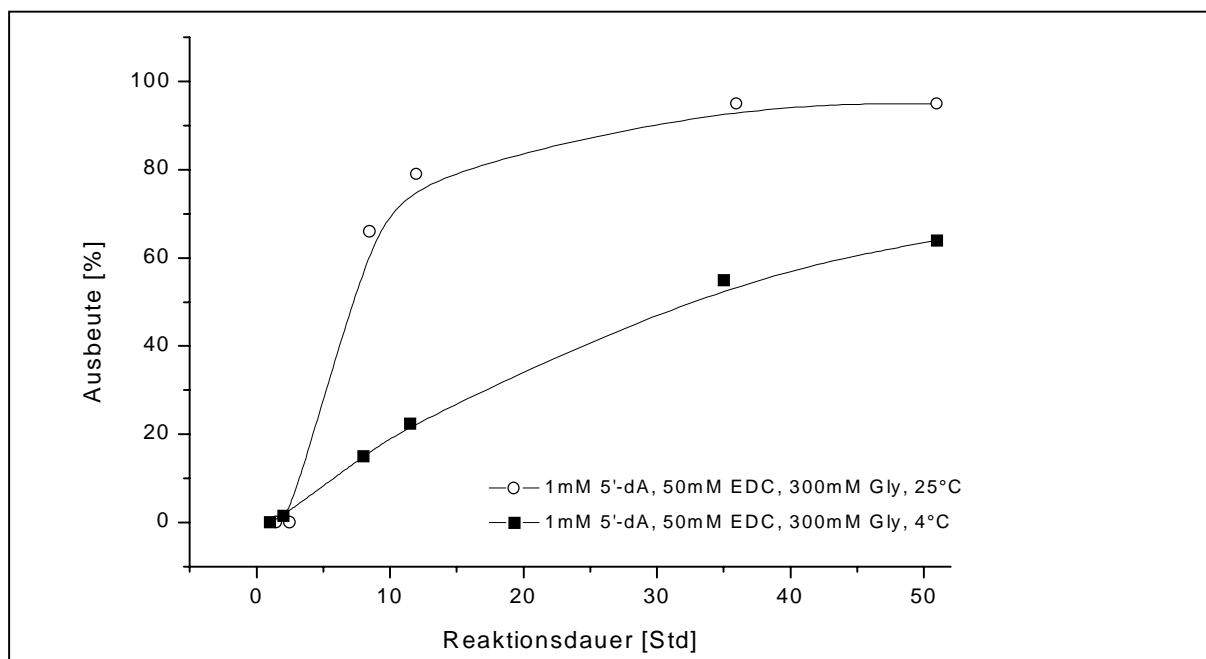


Abb. 56: Temperaturabhängiger Reaktionsverlauf der Bildung von 2'-Desoxyadenosin-5'-glycinethylester-phosphoramidat **45**

Der oben eingesetzte 300fache Überschuß an Glycinethylester ist hinsichtlich der Kosten eines Fluoreszenzmarkers und des Risikos fluoreszenter Nebensignale nicht praktikabel, weshalb die mögliche Reduzierung des Aminüberschusses untersucht wurde. Unter Beibehaltung der Molaritäten für 5'-dA und EDC wurden verschiedene Glycinethylester-Konzentrationen eingesetzt und zu definierten Zeitpunkten Proben der Reaktionslösung kapillarelektrophoretisch untersucht und das Verhältnis aus 5'-dA und 5'-dA-GLY bestimmt (Abbildung 57).

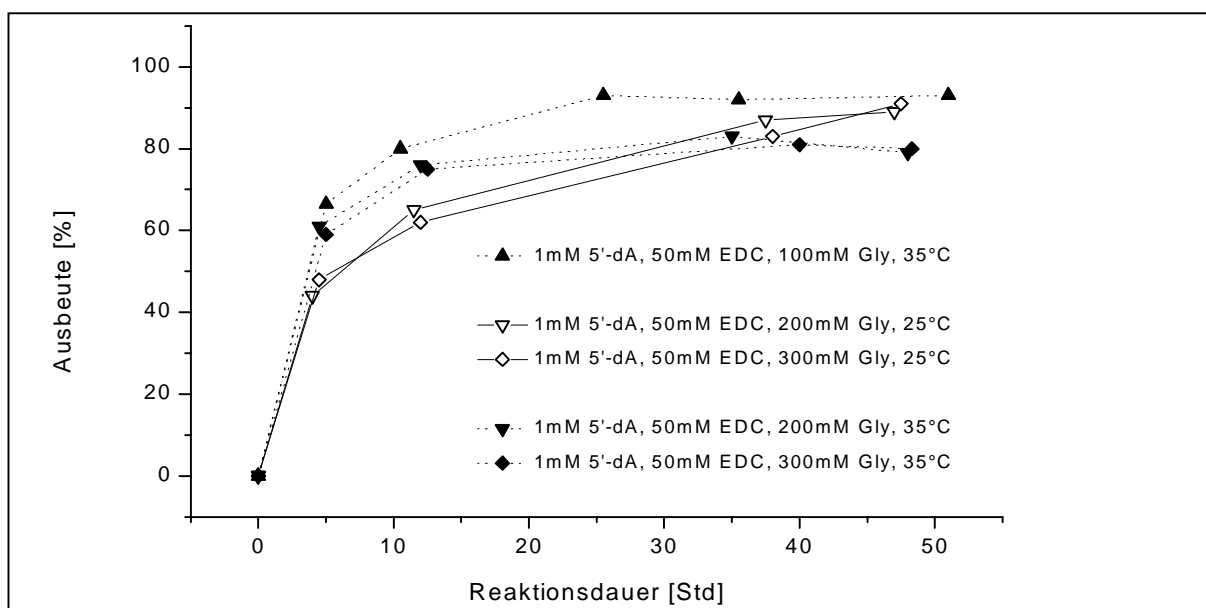


Abb. 57: Temperaturabhängiger Reaktionsverlauf der Bildung von **45** mit unterschiedlichen GLY-Überschüssen

Der Vergleich der in Abbildung 57 dargestellten Kopplungsausbeuten zeigt, daß die Reaktionstemperaturen die Gesamtkopplungsausbeuten nach ca. 50h nicht beeinflußt. Jedoch führt eine Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 35°C dazu, daß die Maximalausbeuten deutlich früher erreicht werden. Zum Beispiel wird bei der Umsetzung von 5'-dA mit 100mM GLY bei 35°C bereits nach 10h eine Ausbeute an Phosphoramidat von 80% erzielt, während die Umsetzung bei 25°C erst nach 25h eine entsprechende Ausbeute liefert. Allgemein ist zu beobachten, daß alle Umsetzungen bei 35°C nach 24h bereits abgeschlossen sind. Ferner ergibt sich aus diesen Untersuchungen, daß ein deutlicher Überschuß an Glycinethylester für eine effektive Umsetzung des Nukleosid-3'-phosphates nötig ist. Reduktion der GLY-Konzentrationen führt zu deutlichen Ausbeuteverlusten. Der Vergleich von Abbildung 56 und 57 zeigt jedoch, daß eine Erhöhung der GLY-Konzentration über einen 100fachen Überschuß hinaus keinen entscheidenden Einfluß auf die Gesamtausbeute hat. Um dies zu verifizieren wurden Umsetzungen mit Glycinethylester-Konzentrationen von 100, 200 und 300mM miteinander verglichen. Abbildung 58 zeigt, daß bei Reaktionstemperaturen von 25°C und 35°C unter den gegebenen Verhältnissen die Erhöhung der Glycinethylester-Konzentration über den 100fachen Überschuß hinaus zu keinen Verbesserungen der Kopplungsausbeuten führt. Bezogen auf den Einsatz eines Fluoreszenzmarkers anstelle von Glycinethylester bedeutet dies allerdings immer noch einen sehr hohen finanziellen Aufwand für die zu entwickelnde Derivatisierungsstrategie.

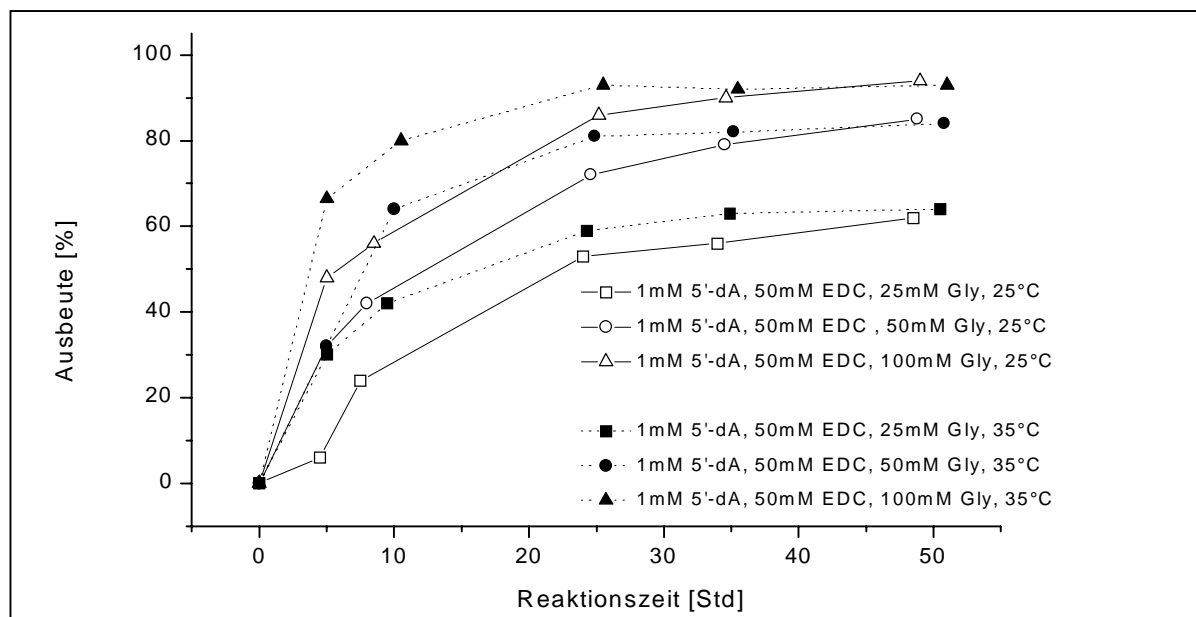


Abb. 58: Temperaturabhängiger Reaktionsverlauf der Bildung von **45** mit hohen GLY-Überschüssen

Im Folgenden wurde deshalb der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen an aktivierendem Carbodiimid bei einer Reaktionstemperatur von 35°C untersucht. Ziel war es, durch Erhöhung der EDC-Konzentration eine Reduzierung der Glycinethylester-Menge zu erreichen. Um einen entsprechenden Einfluß der Aktivator-Konzentration auf den erzielten Kopplungsgrad beobachten zu können, war es notwendig, einen Glycinethylester-Anteil unterhalb der bis dato als optimal ermittelten Konzentration von 100mM zu wählen. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Umsetzungen eine 50mM Glycinethylester-Lösung verwendet. Der Einfluß der EDC-Menge wurde für den Bereich von 10mM bis 300mM bei einer Reaktionstemperatur von 35°C untersucht. Abbildung 59 zeigt die dabei ermittelten Kopplungsausbeuten, die eine deutliche Abhängigkeit der Bildung von 5'-dA-GLY von der eingesetzten Menge an Carbodiimid als aktivierendes Agens zeigen. Interessanterweise führt der Einsatz eines 10fachen Überschusses an EDC bezogen auf das zu aktivierende Nukleotid zu keinerlei Umsetzung, während ein 25facher Überschuß nach einem Tag Reaktionsdauer immerhin eine 50%ige Ausbeute bewirkt. Offensichtlich ist eine gewisse Mindestkonzentration an Carbodiimid für einen erfolgreichen Reaktionsablauf notwendig. Auffallend ist, daß mit zunehmender EDC-Konzentration in der Reaktionslösung die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich zunimmt. So ermöglicht der Einsatz sehr hoher Überschüsse an Carbodiimid wie 200mM- oder 300mM-Lösungen eine nahezu quantitative Umsetzung des Nukleotids bereits nach etwas mehr als 10 Stunden bei einer Verwendung von nur 50mM Glycinethylester.

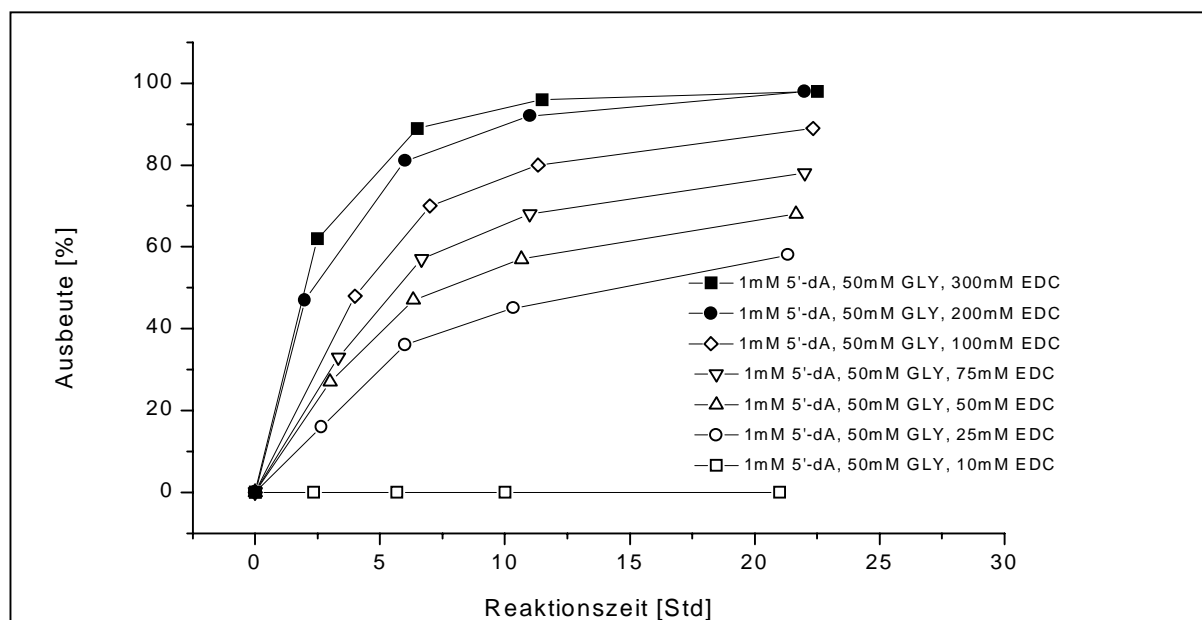


Abb. 59: Reaktionsverlauf der Bildung von **45** in Abhängigkeit der EDC-Konzentration

Dies bedeutet im Vergleich zu den Reaktionsgeschwindigkeiten der oben aufgeführten Umsetzungen mit 50mM EDC-Lösungen (siehe Abbildung 56-58), die entsprechende Ausbeuten trotz deutlich höherem Glycinethylester-Anteils erst nach bestenfalls 24h ergaben, eine deutliche Verbesserung der Reaktion. Gerade in Hinblick auf eine möglichst schonende Behandlung enzymatischer DNA-Hydrolysate bei der angestrebten Fluoreszenz-Derivatisierung für die DNA-Addukt-Analytik sind kurze Reaktionszeiten bei milden Bedingungen wünschenswert.

Nachdem somit gezeigt wurde, daß sich durch einen hohen EDC-Überschuß die Menge an Glycinethylester als Fluoreszenzmarker-Surrogat auf einen 50fachen Überschuß reduzieren läßt, wurde nun untersucht, ob eine weitere Reduktion des GLY-Gehalts bei gleichbleibenden Ausbeuten tolerabel ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 60 aufgeführt. So führt die Verwendung eines 25fachen Überschusses an Glycinethylester in Kombination mit einem 300fachen Überschuß an aktivierendem Carbodiimid nach 24h ebenfalls zu Kopplungsausbeuten im Bereich >90%, während die Kombination 25mM GLY/200mM EDC aufgrund der geringeren EDC-Konzentration unbefriedigender verläuft. Somit ist der Einsatz eines 25fachen Überschusses an derivatisierendem Agens bei gleichzeitigen Einsatz hoher EDC-Überschüsse hinsichtlich der zu erzielenden Kopplungsausbeuten tolerabel und stellt unter Berücksichtigung der Kosten des Fluoreszenzmarkers und des Risikos an Signalrauschen durch Verunreinigungen und Abbauprodukte einen vertretbaren Kompromiß dar.

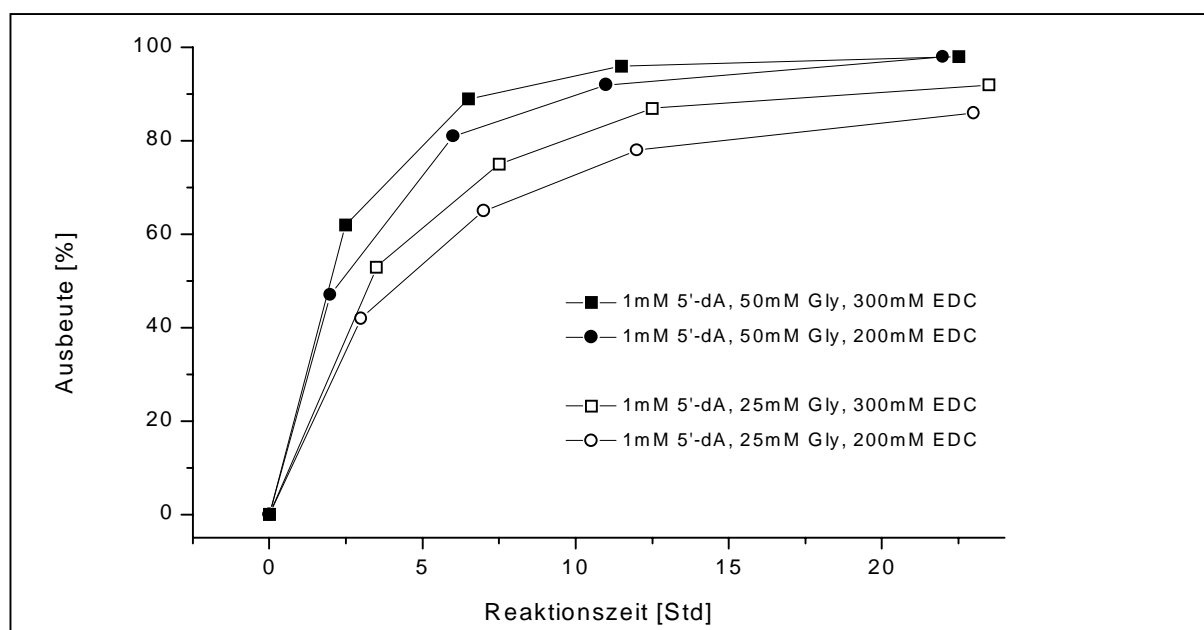


Abb. 60: Reaktionsverlauf der Bildung von **45** in Abhängigkeit unterschiedlicher EDC- und GLY-Konzentrationen



Folglich ergibt sich entsprechend der einleitend dargelegten Kriterien für die Entwicklung einer Derivatisierungsstrategie von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten mit Fluoreszenzmarkern, die eine primäre aliphatische Aminofunktion als Ankergruppe tragen, folgende optimierte Reaktionsbedingungen:

<b>Analysenschritt</b>	<b>optimierte Bedingungen</b>
Fluoreszenzderivatisierung	1mM 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate in 100mM HEPES-Puffer, pH = 6,5 + gleiches Volumen 300mM EDC in 100mM HEPES-Puffer, pH = 6,5 + gleiches Volumen 25mM BODIPY-EDA in 100mM HEPES-Puffer, pH = 6,5 Inkubation der Reaktionslösung bei 35°C für 16-24h

Tab. 4: optimierte Reaktionsbedingungen zur Fluoreszenzderivatisierung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate mittels Phosphoramidat-Technik

Diese optimierten Reaktionsbedingungen ermöglichten die Darstellung größerer Mengen an 2'-Desoxyadenosin-5'-glycinethylester-phosphoramidat **45**, welches mittels RP-HPLC isoliert und durch ESI-Massenspektrometrie, <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie charakterisiert werden konnte.

Diese an einer modellhaften Umsetzung optimierten Reaktionsparameter wurden für alle folgenden Derivatisierungen angewendet. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft des Glycinethylesters mit der Ankergruppe des einzusetzenden Fluoreszenzmarkers und der oben aufgeführten Übertragbarkeit der Kopplungsstrategien von 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphat auf die entsprechenden 3'-Phosphate sollte somit die erfolgreiche Fluoreszenzmarkierung freier Nukleosid-monophosphate gewährleistet sein.

#### **4.1.3.2 Darstellung und Charakterisierung 2'-Desoxynukleosid-BODIPY-phosphoramidaten**

Basierend auf den unter Abschnitt 4.1.3.1 ermittelten Reaktionsbedingungen für die Umsetzung freier Nukleotide mit einem primären aliphatischen Amin unter Carbodiimid-Aktivierung in Wasser wurden zunächst die vier 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphate mit dem Fluoreszenzmarker BODIPY-EDA **42** zu den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Nukleosid-5'-phosphoramidaten **49-52** umgesetzt (Abbildung 61).

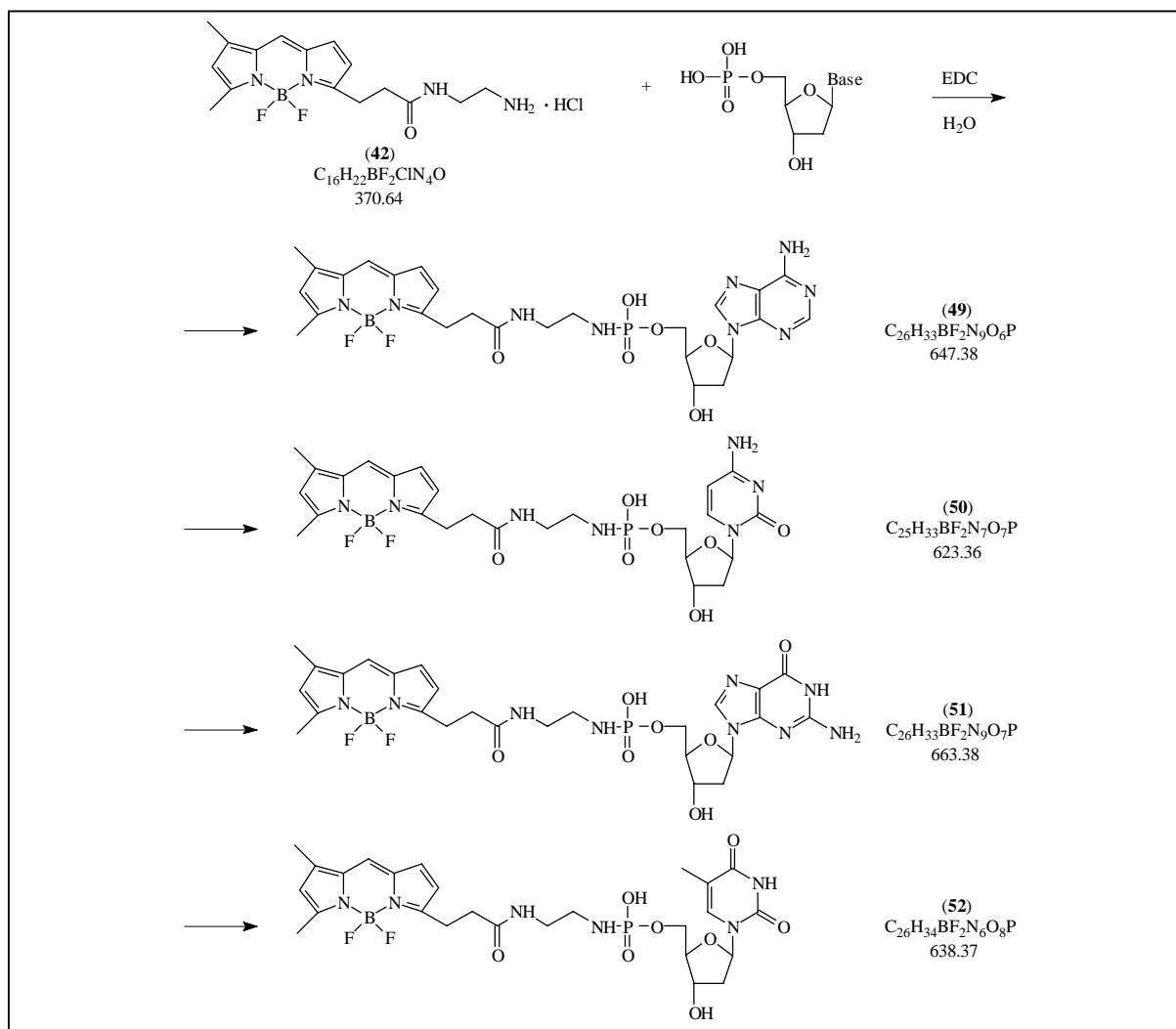


Abb. 61: Darstellung BODIPY-EDA-markierter 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphate; Base = Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin

In separaten Ansätzen wurden jeweils 100µl 1mM 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphat in 100mM HEPES, pH = 6,5, 100µl 300mM EDC in 100mM HEPES, pH = 6,5 und 100µl 25mM BODIPY-EDA in 100mM HEPES, pH = 6,5 vereinigt und 36h bei 35°C unter Schütteln inkubiert. Aufgrund der allgemeinen Photolabilität von Fluoreszenzmarker-Lösungen wurden die Umsetzungen unter Lichtausschluß durchgeführt. Die fluoreszenzmarkierten Nukleotide wurden durch RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion – entsprechend den spektroskopischen Eigenschaften des Fluorophors bei einer Anregungswellenlänge von 503nm und einer Emissionswellenlänge von 510nm – isoliert und über ESI-Massenspektrometrie charakterisiert. Die flüssigkeitschromatographische Trennung der Reaktionsgemische ergab in allen Fällen jeweils nur drei Fluoreszenzsignale, wobei zwei Signale durch Massenspektrometrie als nicht umgesetzter Fluoreszenzmarker bzw. fluoreszenzmarkiertes Nukleotid identifiziert werden konnten. Die dritte fluoreszierende

Komponente hat in allen Fällen und somit unabhängig vom eingesetzten Nukleotid ein Molekulargewicht von 700, was unter Umständen auf eine Dimerisierung des eingesetzten Fluoreszenzmarkers hinweist. Allerdings wurde die genaue Identität dieses in allen Umsetzungen auftretenden Nebenproduktes nicht weiter aufgeklärt.

Eine entscheidende Konsequenz dieser Umsetzungen ist, daß die gewählte Synthesestrategie im Gegensatz zu den unter Abschnitt 4.1.1.2 und 4.1.2 aufgeführten Strategien zur Darstellung fluoreszenzmarkierter Nukleotide zu keinen Mehrfachmarkierungen führt und sich somit zur einheitlichen Derivatisierung eignet.

Die Menge der isolierten Produkte wurde nach *Lambert-Beer* [111] durch Messung der Absorption der markierten Nukleotide bei 503nm anhand des molaren Extinktionskoeffizienten des Fluorophors [123] bestimmt. Die auf diese Weise ermittelten Ausbeuten an 2'-Desoxynukleosid-5'-BODIPY-phosphoramidaten **49-52** waren mit 10% (**49**), 24% (**50**), 17% (**51**) und 24% (**52**) deutlich geringer als die unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführten Glycinethylester-Kopplungen. Diese unerwartet niedrigen Ausbeuten deuten darauf hin, daß der sterisch anspruchsvollere Fluoreszenzmarker trotz ausreichend hohem Überschuß eine effektivere Konjugation erschwert.

Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wurden die 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate **22-25** mit dem Fluoreszenzmarker **42** umgesetzt (Abbildung 62) und mittels RP-HPLC isoliert und nach *Lambert-Beer* [111] quantifiziert. Die flüssigkeitschromatographischen Eigenschaften entsprechen den oben genannten Umsetzungen der 5'-Phosphate. Auch in diesem Fall erhält man drei Signale bei der Fluoreszenzdetektion der Reaktionslösungen, wobei die Signale des Markerüberschusses und des Abbauproduktes exakt mit jenen der 5'-Markierung übereinstimmen.

Interessanterweise sind die bei der Umsetzung der 3'-Phosphate mit BODIPY-EDA erzielten Kopplungsausbeuten im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Umsetzungen mit Glycinethylester (Tabelle 3) im Falle von Adenosin, Cytidin und Guanosin höher als die der entsprechenden 5'-Phosphoramidate (Tabelle 5).

Nukleotid	5'-Phosphoramidat	3'-Phosphoramidat
Adenosin	10% <b>49</b>	34% <b>53</b>
Cytidin	24% <b>50</b>	26% <b>54</b>
Guanosin	17% <b>51</b>	24% <b>55</b>
Thymidin	24% <b>52</b>	24% <b>56</b>

Tab 5: Vergleich der Kopplungsausbeuten der Umsetzung von 2'-Desoxynukleosid-5'- und -3'-phosphaten mit BODIPY-EDA unter EDC-Aktivierung

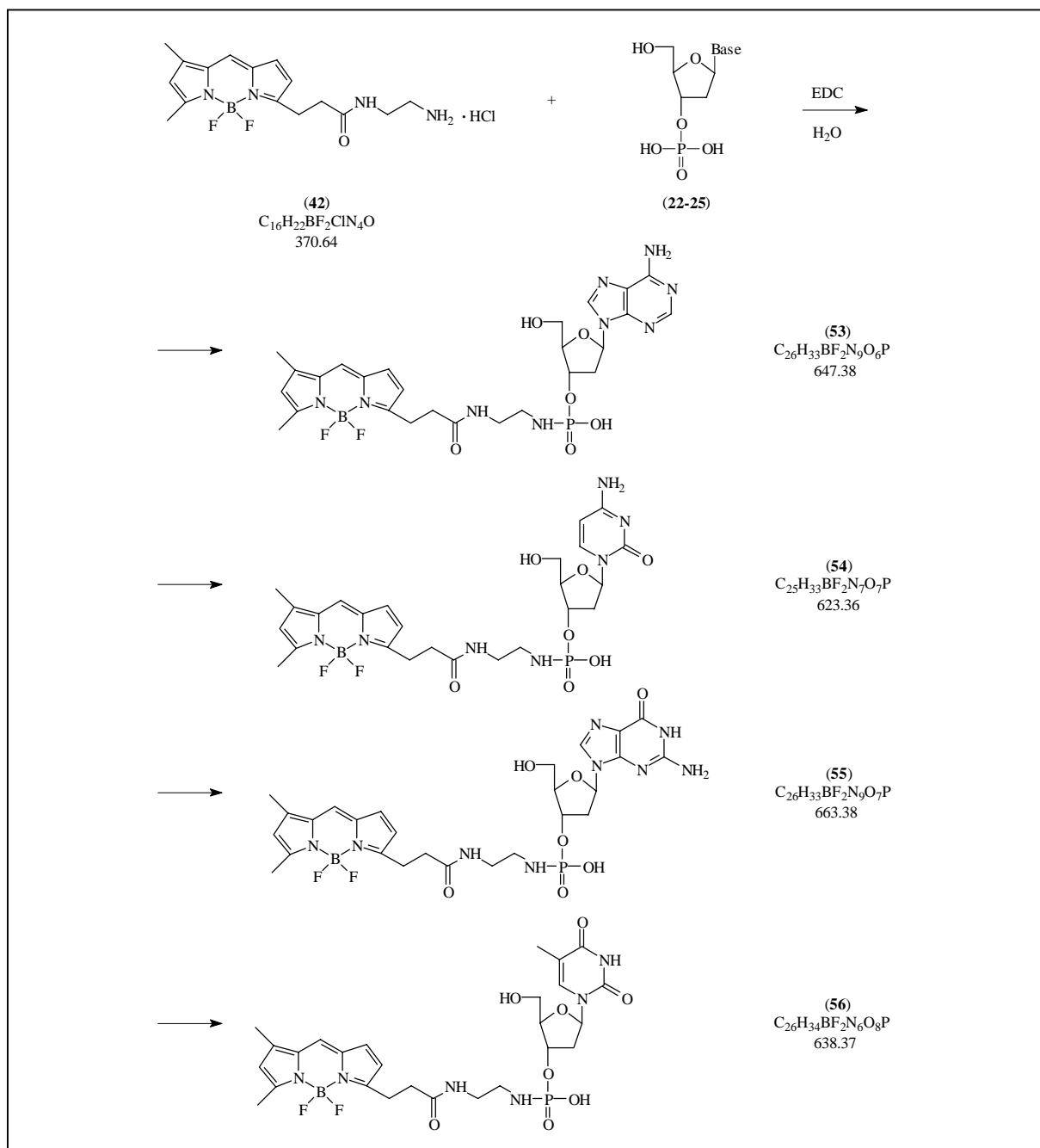


Abb. 62: Darstellung BODIPY-EDA-markierter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate; Base = Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin

Die Identität der flüssigkeitschromatographisch isolierten fluoreszenzmarkierten 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphoramidate **53-56** wurde mittels ESI-Massenspektrometrie bestätigt. Stellvertretend sind die –Q1-ESI-Massenspektren der markierten Purin-Nukleotide **55** und **53** in Abbildung 63 und 64 dargestellt.

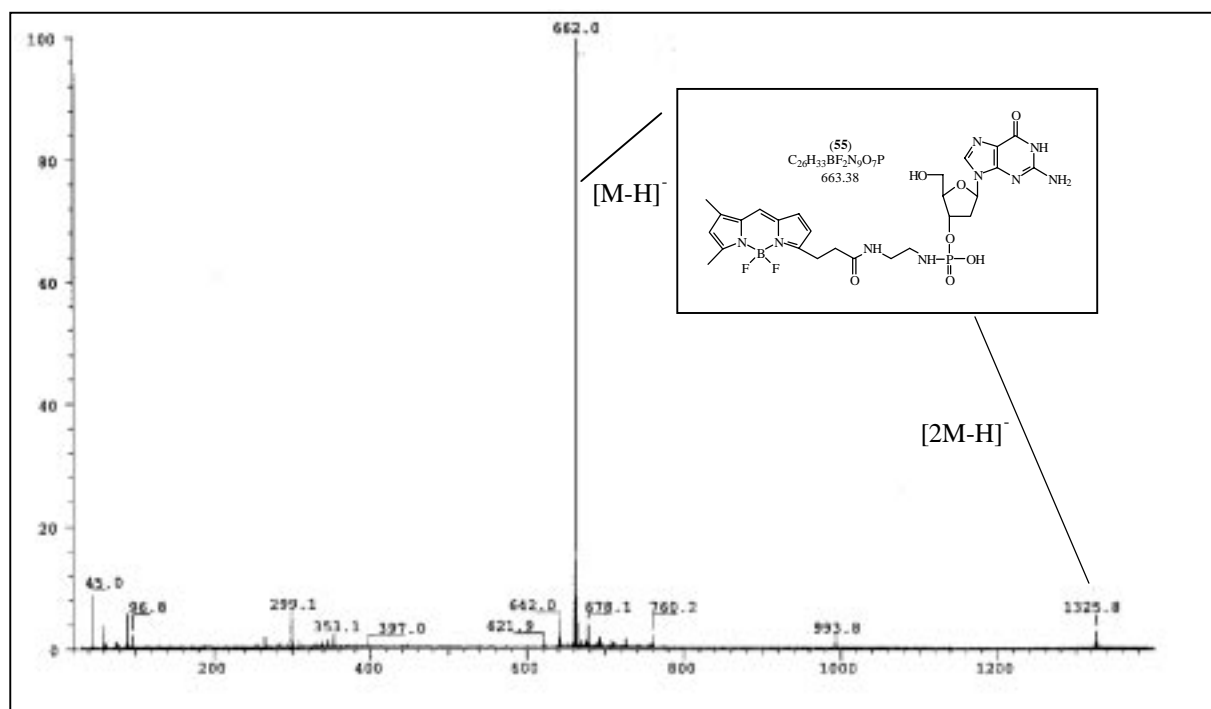


Abb. 63: -Q1-ESI-Massenspektrum von 2'-Desoxyguanosin-3'-BODIPY-phosphoramidat **55**.

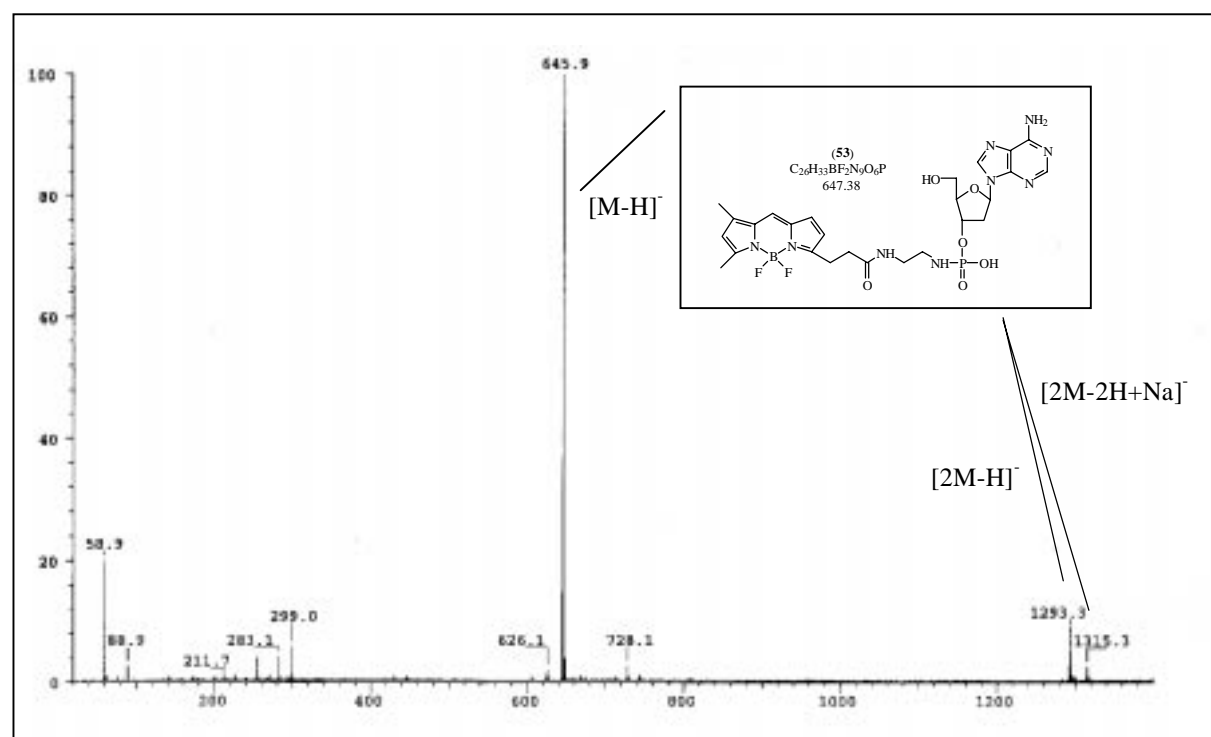


Abb. 64: -Q1-ESI-Massenspektrum von 2'-Desoxyadenosin-3'-BODIPY-phosphoramidat **53**.

Da die erzielten Kopplungsausbeute für 2'-Desoxyadenosin-3'-BODIPY-phosphoramidat **53** am höchsten war, wurde diese Substanz modellhaft in größeren Mengen synthetisiert und mittels  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{19}\text{F}$ - und  $^{11}\text{B}$ -NMR-Spektroskopie umfassend charakterisiert.

Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen der Kopplung des Fluoreszenzmarkers an die Nukleotide mittels kapillarelektrophoretischer Reaktionskontrolle und UV-Detektion ist wegen den geringen Konzentrationen in der Probe nicht möglich. Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der Injektionsvolumina bei der Kapillarelektrophorese (siehe Abschnitt 2.5.5) ist für eine quantitative Bestimmung der fluoreszenzmarkierten Nukleotide die Verwendung eines internen Standards unabdingbar [111]. Aufgrund der Laser-induzierten Fluoreszenz-Detektion kann nicht wie im Falle der Glycinethylester-Kopplung Edukt und Produkt simultan detektiert und das Verhältnis als Maß der erzielten Ausbeute verwendet werden. Die als interner Standard einzusetzende Substanz muß demnach mit dem gleichen LIF-System wie der Fluoreszenzmarker detektierbar sein. Somit bieten sich alle gängigen Fluoreszenzmarker mit Extinktionsmaxima bei ca. 480-500nm an. Der interne Standard darf allerdings durch die Reaktionsmatrix nicht beeinflußt werden. Im speziellen Fall Carbodiimid-aktivierter Umsetzungen erweist sich dies als nicht zu lösendes Problem, da alle als interne Standardverbindungen in Frage kommenden fluoreszierenden Substanzen ihrerseits Carbodiimid-aktivierbare Fluoreszenzmarker darstellen. Alle Versuche, dennoch ein Monitoring des Reaktionsverlaufes der Fluoreszenzderivatisierung mit BODIPY-EDA durchzuführen, scheiterten aufgrund nicht reproduzierbarer Resultate. So wurde versucht, die Reaktion zu bestimmten Zeitpunkten durch Verdünnung eines Aliquots abzustoppen und mit einer Fluorescein-Lösung bekannter Konzentration zu versetzen. Ein anderer Lösungsansatz bestand darin, das Carbodiimid in den Reaktionsproben vor Zugabe der als internen Standard dienenden Fluorescein-Lösung durch 2-Mercaptoethanol zu quenchen [174], damit Fluorescein nicht durch die Reaktionsmatrix beeinflußt wird. Abbildung 63 zeigt exemplarisch die Ergebnisse, die bei der Untersuchung des Reaktionsverlaufs der Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxyadenosin-3'-phosphat **22** mit BODIPY-EDA **42** unter den oben genannten optimierten Reaktionsbedingungen erzielt wurden. Zu definierten Zeitpunkten wurden jeweils 5µl Reaktionslösung entnommen und mit 495µl einer 150mM wäßrigen 2-Mercaptoethanol-Lösung verdünnt. 5µl dieser Lösung wurden dann mit 495µl einer 10nM wäßrigen Fluorescein-Lösung versetzt und kapillarelektrophoretisch untersucht. Zur Bestimmung der Kopplungsrate wurde das Verhältnis aus den Fluoreszenzsignalen des Nukleotid-BODIPY-Konjugats **53** und Fluorescein gebildet und in Abhängigkeit zur Reaktionszeit aufgetragen.

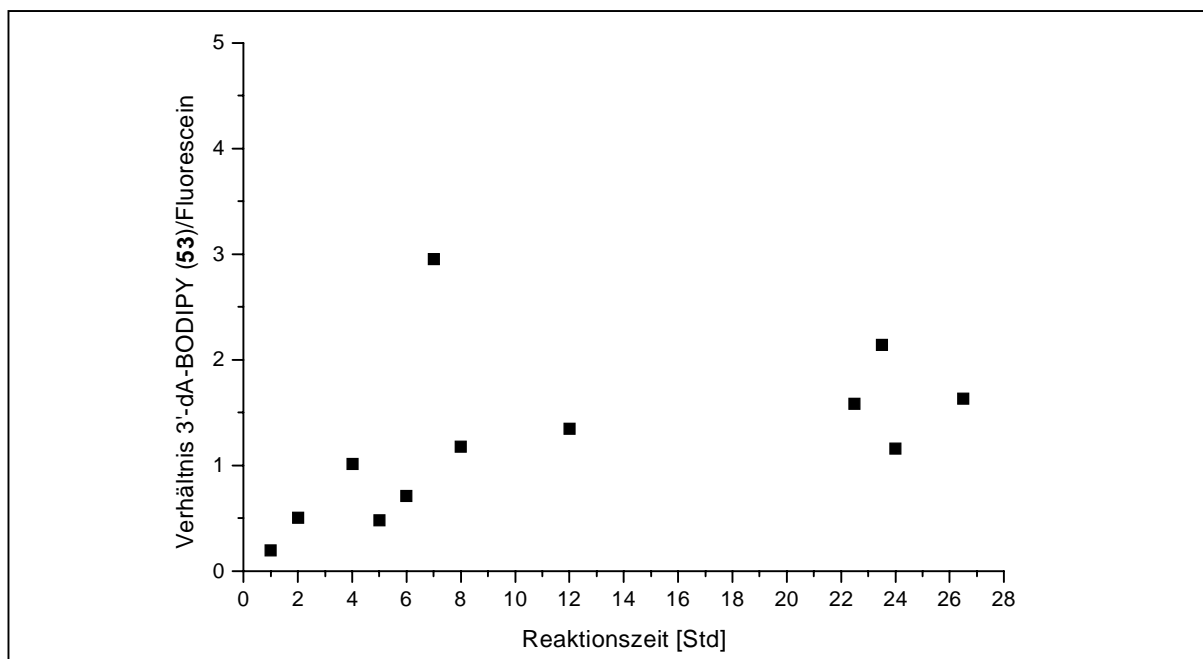


Abb. 65: Reaktionsverlauf der Bildung von 2'-Desoxyadenosin-3'-BODIPY-phosphoramidat **53**

Abbildung 65 zeigt, daß die Reaktionskontrolle der Fluoreszenzderivatisierung mit der Kapillarelektrophorese aufgrund der nicht zu lösenden Schwierigkeiten beim Einsatz eines inerten internen Standards unbefriedigend verläuft. Die Reaktion scheint entsprechend der unter Abschnitt 4.1.3.1 gemachten Erfahrungen nach 16 bis 20 Stunden abgeschlossen zu sein. Die großen Schwankungen der Messwerte machen jedoch eine Optimierung auf der Basis dieser Reaktionskontrolle unpraktikabel. Hinsichtlich der angestrebten Derivatisierung enzymatischer DNA-Hydrolysate wurde somit auf eine weitere Optimierung der Reaktion an dieser Stelle verzichtet. DNA-Hydrolysate stellen wegen ihres Gehaltes an Enzymen und Puffersubstanzen ein weitaus komplexeres Reaktionsgemisch im Vergleich zu den oben angeführten Umsetzungen der reinen Mononukleotide dar. Aus diesem Grund mußte zuerst die Durchführbarkeit dieser Derivatisierungsstrategie für DNA-Hydrolysate bewiesen werden, bevor weitere Optimierungsuntersuchungen durchgeführt werden sollten.

#### 4.1.3.3 Alternative Strategien zur Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden mittels Phosphoramidat-Methode

Eine unabdingbare Voraussetzung für die Durchführbarkeit der unter Abschnitt 4.1.3.2 dargestellten Fluoreszenzderivatisierung von Mononukleotiden ist der Ausschluß von funktionellen Gruppen, die ebenfalls durch das verwendete Carbodiimid aktiviert werden können. Allerdings tragen die gängigsten Fluoreszenzmarker wie Fluorescein- oder

Rhodamin-Derivate Carbonsäuregruppen, die durch das verwendete EDC in starkem Maße aktiviert werden. Dies birgt die Gefahr des frühzeitigen Verlusts an aktivierendem Agens in der Reaktionslösung und somit drastisch sinkenden Ausbeuten an gewünschter Zielsubstanz. Darüberhinaus könnte durch Eigenkondensation des im Überschuß eingesetzten Markers oder durch Nukleotid-Marker-Kopplungen über die exozyklischen Aminofunktionen der Basen und den Säuregruppen der Marker eine nicht kontrollierbare Menge an Nebenprodukten entstehen, die die Interpretation kapillarelektrophoretischer Analysen unmöglich macht.

Der Einsatz von Fluoresceinen oder Rhodaminen würde demnach die Isolierung des Carbodiimid-aktivierten Nukleotids notwendig machen. *Murphy* [175] beschrieb die Isolierung des aktivierten Intermediats aus Adenosintriphosphat (ATP) und EDC aus Acetonitril mittels RP-HPLC. Allerdings gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, dieses reaktive Intermediat kapillarelektrophoretisch nachzuweisen, da die Halbwertszeit dieser reaktiven Substanz in Wasser weniger als 5 Minuten [175] beträgt. In Anbetracht der in Abschnitt 4.1.3.1 ermittelten Reaktionszeiten von mindestens 10 Stunden erweist sich diese Strategie somit als nicht praktikabel. Darüberhinaus würde sich eine solche Vorgehensweise nur sehr schwer auf die Verhältnisse enzymatischer DNA-Hydrolysate übertragen lassen.

Durch die Zugabe von N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS) lassen sich bei Carbodiimid-aktivierten Proteinkonjugationen deutliche höhere Ausbeuten erzielen. So beschreiben *Staros et al.* [176] eine Steigerung der Kopplungsrate von Glycin an Hemocyanin auf das 15fache durch Zugabe 5mM NHS-Lösung. Die systematische Untersuchung der Konjugation des antiviralen Agens 3-Azido-2,3-didesoxythymidin (AZT) an das Neoglycoprotein Lactose<sub>28</sub>-HSA durch *Kuipers et al.* [177] ergab, daß die Hydrolyse des aktivierten Komplexes aus AZT und EDC durch die Bildung eines aktiven Esters mit NHS unterdrückt wird. Dieses aktive AZT-NHS-Konjugat koppelt dann an die  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppen der Lysine des Proteins. Die Generierung eines deutlich stabileren AZT-NHS-Konjugats resultierte in einer zehnfachen Steigerung der Reaktionsausbeute. Bezüglich der oben dargestellten Probleme bei der Umsetzung enzymatischer DNA-Hydrolysate mit carbonsäurehaltigen Fluoreszenzmarkern eröffnet sich somit die Möglichkeit, EDC-aktivierte Nukleotide in entsprechende NHS-Konjugate zu überführen. Überschüssiges EDC könnte dann mittels Hydroxylamin oder 2-Mercaptoethanol [174] gequencht werden, bevor die NHS-Konjugate anschließend mit dem entsprechenden Fluoreszenzmarker umgesetzt werden. Diese Derivatisierungsstrategie ist für 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphate in Abbildung 66 skizziert.



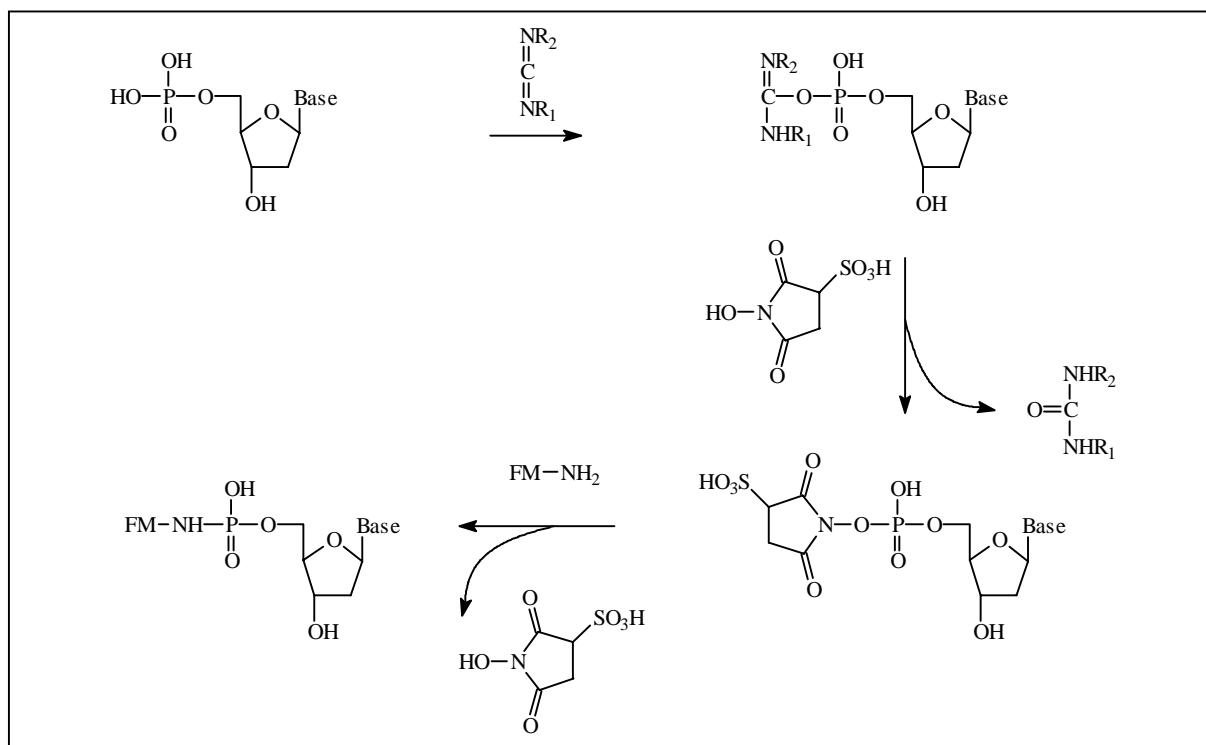


Abb. 66: NHS-vermittelte Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphaten; Base = Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin; FM = Fluoreszenzmarker

Im Rahmen der Reaktionsoptimierung für die Kopplung von Glycinester an 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat (siehe Abschnitt 4.1.3.1) wurden auch entsprechende Umsetzungen unter NHS-Zugabe kapillarelektrophoretisch untersucht. Bei diesen Untersuchungen konnten keine entsprechenden aktivierten Ester aus NHS und Nukleotid detektiert werden. Die Umsetzungen mit unterschiedlichen Rhodamin- und Fluorescein-Derivaten unter Einsatz von NHS führten ebenfalls zu keinem Erfolg. Aufgrund der erfolgreichen Fluoreszenzmarkierung mit dem Carbonsäure-freien BODIPY-EDA, wurde diese Synthesestrategie nicht weiter im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Fluorescein- und Rhodamin-Derivate stehen im Gegensatz zu BODIPY-Derivaten für fast jeden Wellenlängenbereich zur Verfügung, so daß diese Form der Reaktionsführung für die Darstellung speziell gelabelter Standardverbindungen von Bedeutung werden könnte.

Eine weitere Möglichkeit der Reaktionsführung stellt die 1999 von *Kibler und Bächmann* vorgestellte Phasentransfer-katalysierte Fluoreszenzmarkierung einfacher Carbonsäuren dar [178] (Abbildung 67).

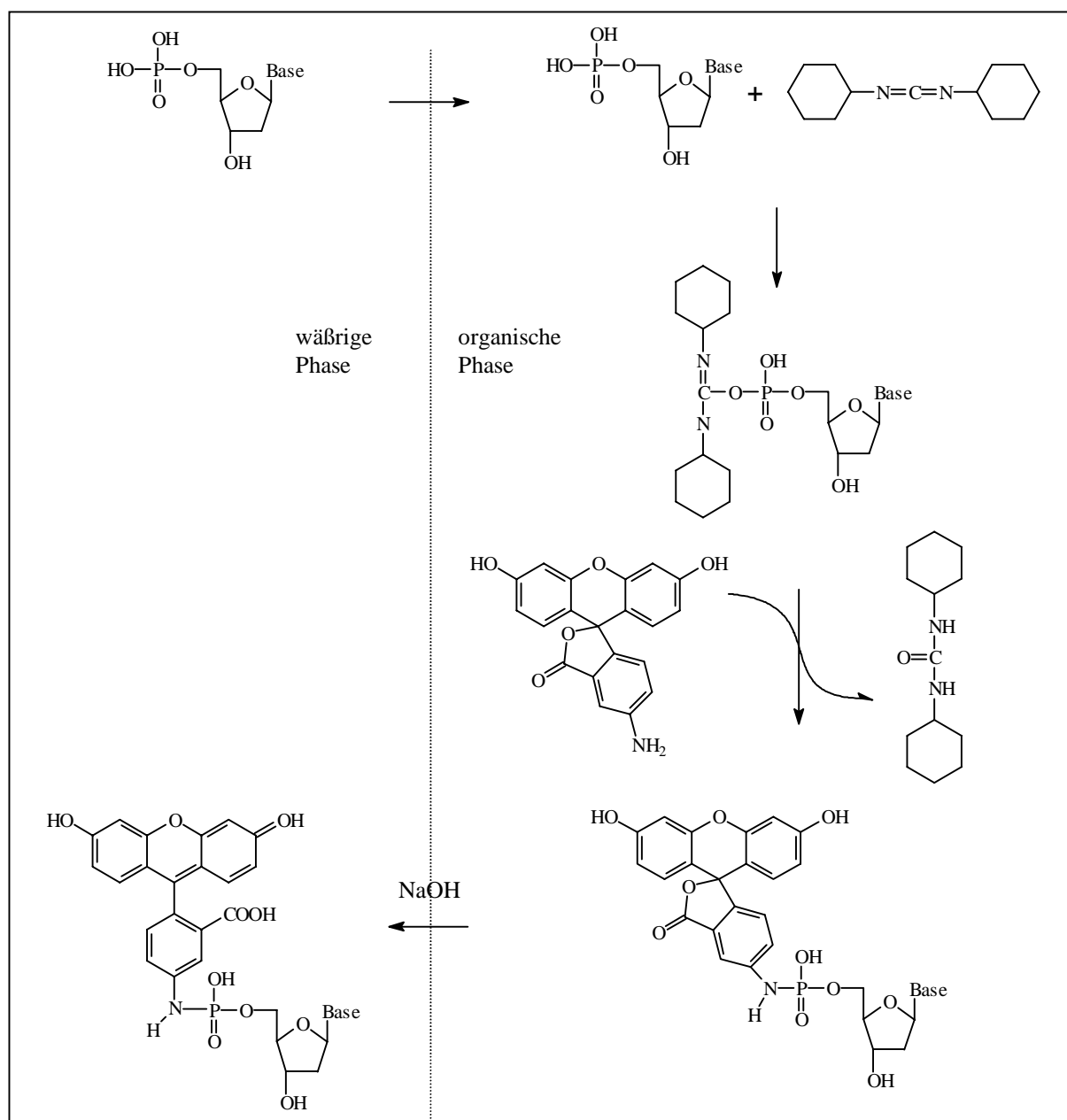


Abb. 67: Phasentransfer-katalysierte Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden nach Kibler und Bächmann

In diesem Fall wird 4-Aminofluorescein in seiner chinoiden Form in organischen Solventien mit DCC-aktivierten Carbonsäuren umgesetzt. Durch die Verwendung organischer Solventien und den dadurch möglichen Einsatz chinoider Tautomere wird das Risiko der Marker-Aktivierung durch das Carbodiimid vermieden. In der basenvermittelten Rückextraktion des gebildeten fluoreszenzmarkierten Substrats wird dabei das Fluorescein in seine fluoreszente Form überführt. Abbildung 67 zeigt schematisch eine entsprechende Umsetzung für 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphate. Modellhafte Umsetzungen von 4-Aminofluorescein mit 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat mit Diethylether als organische Phase lieferten keine detektierbaren Produkte. Obwohl selbst so hydrophile Substrate wie Essigsäure, wenn auch

nur in geringem Maße, auf diese Weise derivatisiert werden können [178], gelang die Übertragung dieser Strategie auf Mononukleotide nicht. Allerdings könnte diese Art der Reaktionsführung zur Derivatisierung stark lipophiler DNA-Addukte wie sie zum Beispiel polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe darstellen, von Bedeutung werden. So wäre es denkbar, lipophile Addukte durch die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gegenüber den unmodifizierten Nukleotiden anzureichern und nahezu ausschließlich zu derivatisieren.

#### 4.1.3.4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Technik zur Fluoreszenzderivatisierung sowohl von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten als auch 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphaten in wässrigen Medien entwickelt, die auf die Verhältnisse enzymatisch hydrolysierten DNA übertragbar sein sollte. Diese Derivatisierungsstrategie verläuft im Gegensatz zu bisher bekannten Methoden in einer Ein-Schritt-Reaktion ohne zwischenzeitliche Aufarbeitung des Reaktionsgemisches und führt zu einheitlich derivatisierten Substraten. Sie beruht auf einer Carbodiimid-aktivierten Kopplung der Phosphatgruppe der Nukleotide an einen Fluoreszenzmarker, der eine primäre, aliphatische Aminogruppe als Ankergruppe besitzt, unter Ausbildung eines Phosphoramidats. Dabei ist aufgrund der Carbodiimid-Aktivierung von besonderer Bedeutung, daß weder der Fluoreszenzmarker noch die eingesetzten Puffersubstanzen Carbonsäure- oder Phosphatgruppen tragen. Anhand der modellhaften Umsetzung des Fluoreszenzmarker-Surrogats Glycinethylester mit 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat wurde die Puffersubstanz, der pH-Wert der Reaktionslösung, die Reaktionstemperatur, die Reaktionszeit und die einzusetzenden stöchiometrischen Verhältnisse der Reaktanden mittels kapillarelektrophoretischer Reaktionskontrolle optimiert. Dabei konnten Bedingungen gefunden werden, die eine nahezu quantitative Umsetzung bei minimalem Einsatz an Fluoreszenzmarker-Surrogat gewährleisten. Die dargestellten 2'-Desoxynukleosid-glycinethylester-phosphoramidate konnten flüssigkeitschromatographisch isoliert, über ESI-Massenspektrometrie und im Fall des Adenosin-5'-phosphoramidats **49** auch mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Die Anwendung der bei dieser Modellreaktion optimierten Bedingungen auf die Darstellung BODIPY-EDA-fluoreszenzmarkierter Nukleotide gelang, wenngleich die erzielten Ausbeuten aufgrund der sterischen Anforderungen des Fluoreszenzmarkers sanken. Die Derivatisierungsmethode ermöglichte die Darstellung von fluoreszenzmarkierten 2'-Desoxynukleosid-monophosphaten, die

flüssigkeitschromatographisch isoliert und mittels ESI-Massenspektrometrie, im Fall des Adenosin-3'-phosphoramidats **53** auch mittels  $^{13}\text{C}$ -,  $^1\text{H}$ -,  $^{19}\text{F}$ - und  $^{11}\text{B}$ -NMR, charakterisiert wurden. Die Etablierung einer kapillarelektrophoretischen Reaktionskontrolle der Fluoreszenzderivatisierung gelang nicht, da kein geeigneter interner Standard verfügbar war beziehungsweise kein definierter Reaktionsabbruch durch Verdünnung oder Abfangen des aktivierenden Carbodiimids zu erzielen war. Somit ist eine Grundvoraussetzung für den Einsatz einer Substanz als interner Standard, nämlich die chemische Inertheit unter den gegebenen Bedingungen, nicht ausreichend gewährleistet. Die erzielten Ausbeuten der Fluoreszenzderivatisierung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten mit BODIPY-EDA von 24-34% (siehe Tabelle 4) bedeuten dennoch eine ausreichende Kopplungsrate für den Einsatz in der DNA-Addukt-Analytik.

## **4.2 Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Applikation zur Trennung fluoreszenzmarkierter Mononukleotide**

Die in Abschnitt 4.1.3.2 aufgeführte Darstellung BODIPY-markierter Nukleotide ermöglichte nun die Ermittlung kapillarelektrophoretischer Parameter zur Trennung fluoreszenzmarkierter Mononukleotide. Ziel war die vollständige Trennung der vier derivatisierten Nukleotide innerhalb kurzer Analysenzeiten und die Identifizierung der erhaltenen Signale durch Aufstocken mit Referenzsubstanzen. Die Trennungen wurden in einer nicht-oberflächenbehandelten fused-silica-Kapillare der Gesamtlänge 50cm (effektive Länge bis zum Detektionsfenster = 45,4cm) mit einem Durchmesser von 50 $\mu\text{m}$  durchgeführt und die Analyten durch Laser-induzierter Fluoreszenz bei 488nm Anregungswellenlänge (Argon-Ionen-Laser) detektiert. Die Trennungsspannung betrug 20 kV (400 V/cm) mit kathodischem Outlet. Die Injektion der Analyten erfolgte hydrodynamisch mit 10 psi·s. Aufgrund der Phosphatgruppe in den Mononukleotiden liegen die Analyten in neutralen und alkalischen pH-Bereichen als Anionen vor und besitzen somit eine zur Anode gerichtete elektrophoretische Mobilität. Um einen steten, reproduzierbaren elektroosmotischen Fluß zur Kathode zu gewährleisten, werden Trennungen in nicht-oberflächenbehandelten Kapillaren mit alkalischen Trennpuffern bei pH-Werten von 9-11 durchgeführt. Der so erzeugte EOF wirkt der elektrophoretischen Mobilität der Nukleotide entgegen und gewährleistet, daß alle Probenkomponenten – positive wie negative Analyten – zum kathodischen Outlet migrieren (siehe Abschnitte 2.2.3.2 und 2.2.6.1). Ausgehend von diesen Basisbedingungen sollte der zu entwickelnde Trennpuffer hinsichtlich der verwendeten Puffersubstanz, des pH-Wertes, der

Pufferkonzentration und der Selektivität durch Detergenzien und organische Modifier optimiert werden. Als weiteres sollte die Nachweisgrenze für fluoreszenzmarkierte Mononukleotide unter den optimierten Trennbedingungen mittels Laser-induzierter Fluoreszenz bestimmt werden. Wie in Abschnitt 2.1.4 aufgeführt, ist die Nachweisgrenze einer analytischen Methode zur Detektion von DNA-Addukten aufgrund ihrer geringen Konzentration *in vivo* von entscheidender Bedeutung. Ferner sollten die spektroskopischen Eigenschaften des Nukleotid-konjugierten Fluorophors unter den entwickelten kapillarelektrophoretischen Bedingungen untersucht werden, da die Quantenausbeute von Fluoreszenzmarkern umgebungsabhängig ist (siehe Abschnitt 2.3.1.1) [123].

#### 4.2.1 Optimierung der Trennparameter

Kapillarelektrophoretische Trennungen BODIPY-markierter 2'-Desoxynukleotide in unbeschichteten fused-silica-Kapillaren wurden von Wang und Giese bereits in der Literatur beschrieben [158]. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft dieser 2'-Desoxynukleosid-5'-BODIPY-phosphorimidazolide (siehe Abschnitt 2.3.2) mit den in dieser Arbeit dargestellten 2'-Desoxynukleosid-3'-BODIPY-phosphoramidate **53-56** wurde zur Optimierung der kapillarelektrophoretischen Trennparameter von dem dort beschriebenen Trennpuffer ausgegangen. Dieser Trennpuffer besteht aus 5mM Natriumtetraborat, pH = 10,4 und 5% Acetonitril als organischer Modifier. In Abbildung 68 ist das Elektropherogramm einer äquimolaren Mischung (jeweils 60nM) von dA-3'-BODIPY **53**, dC-3'-BODIPY **54** und dG-3'-BODIPY **55** dargestellt.

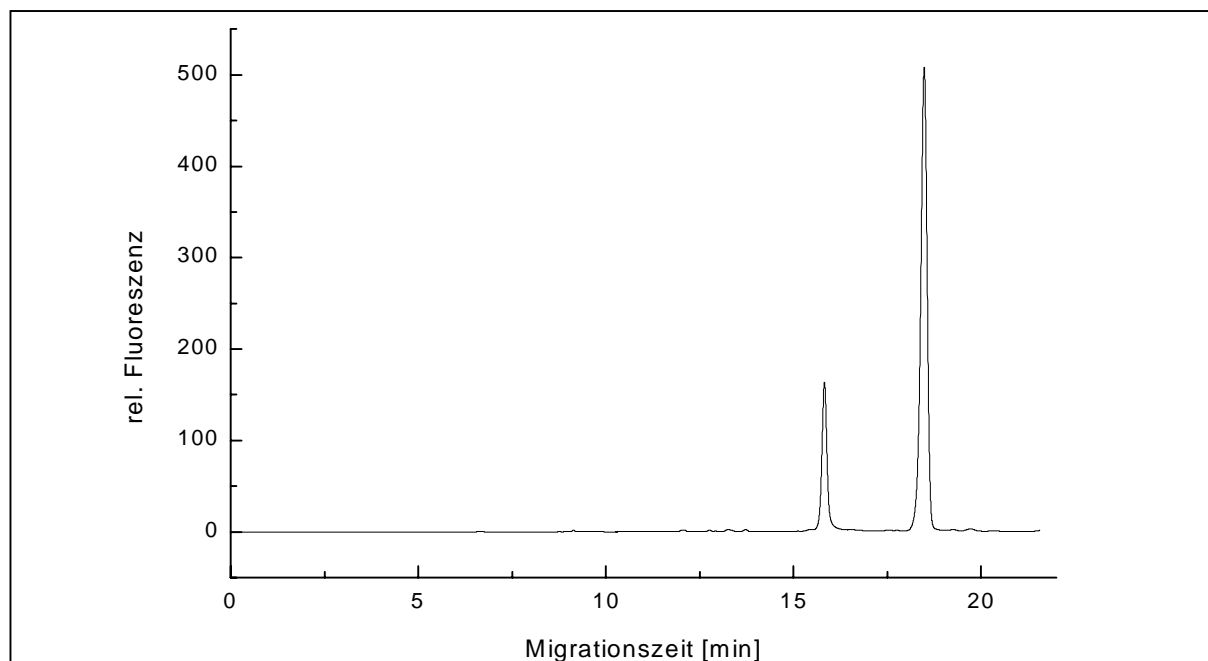


Abb. 68: Elektropherogramm der Trennung dreier BODIPY-markierter Nukleotide (**53**, **54**, **55**) mittels CZE; Trennpuffer: 5mM Natriumtetraborat, pH = 10,4 und 5% Acetonitril [158]

Die gewählte Pufferkonzentration ist aufgrund der Peaksymmetrie zwar geeignet, jedoch konnte eine Trennung aller drei Analyten unter diesen Bedingungen nicht erzielt werden. Obwohl die fluoreszenzmarkierten 5'-Phosphate eine ähnliche Struktur wie die in dieser Arbeit synthetisierten 3'-Phosphoramidate haben, können Polarisationsunterschiede zu einer veränderten Hydrathülle und somit zu anderen effektiven Ladungsdichten führen, die eine vollständige Trennung verhindern. Neben Boratpuffern werden in der Kapillarelektrophorese oftmals auch Phosphatpuffer eingesetzt, die eine deutlich höhere Mobilität besitzen. Abbildung 69 zeigt das Elektropherogramm der Kapillarzonen- elektrophorese der äquimolaren Mischung jeweils 60nM) aus dA-3'-BODIPY **53**, dC-3'-BODIPY **54** und dG-3'-BODIPY **55** mit einem 20mM Natriumphosphat-Puffer, pH = 9,0. Obwohl eine sehr symmetrische Peakform durch die Wahl der richtigen Pufferkonzentration erreicht wurde, zeigt es sich, daß eine Trennung der Phosphoramidate ohne Zusatz von Pufferadditiven, rein auf der Basis der Ladungsdichte-Unterschiede der Analyten, nicht möglich ist.

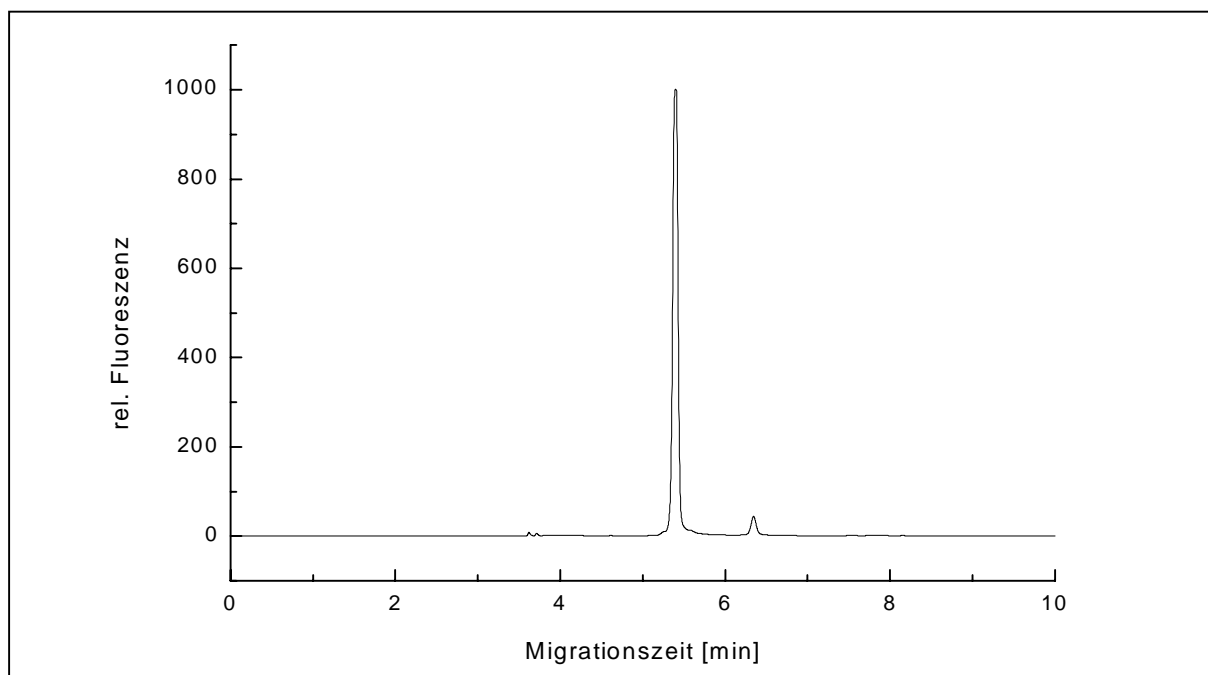


Abb. 69: Elektropherogramm dreier BODIPY-markierter Nukleotide (**53**, **54**, **55**) mittels CZE; Trennpuffer: 20mM Natriumphosphatpuffer, pH = 9,0

Ohne die zusätzliche Selektivitätserhöhung durch einen Micellenbildner ist eine Trennung der vier fluoreszenzmarkierten Mononukleotide und deren Modifikationen (DNA-Addukte) nicht zu erwarten. Aus diesen Gründen wurde in den folgenden Untersuchungen zur Entwicklung eines Trennsystems Phosphatpuffer mit SDS als Detergenz verwendet.

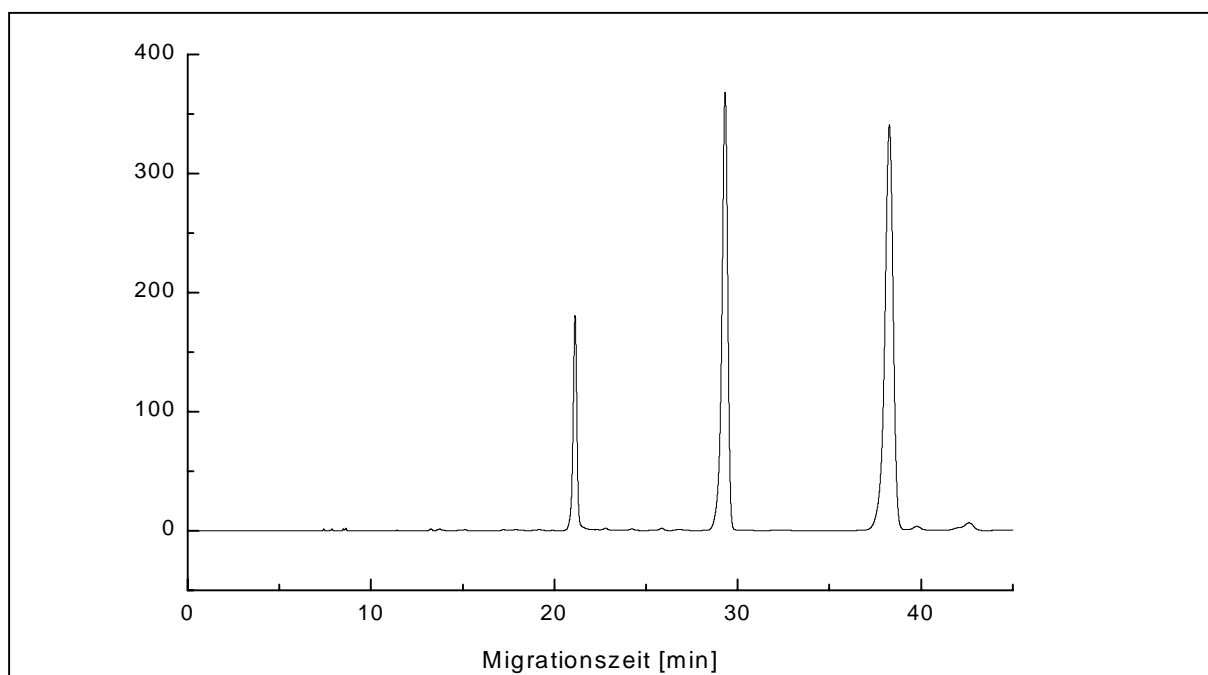


Abb. 70: Elektropherogramm der Trennung dreier BODIPY-markierter Nukleotide (**53**, **54**, **55**) mittels MEKC; Trennpuffer: 20mM Natriumphosphatpuffer, pH = 9,0, 100mM SDS

Abbildung 70 zeigt, daß die Zugabe von 100mM SDS als Micellenbildner zu 20mM Natriumphosphat, pH = 9,0 die Selektivität des Trennpuffers deutlich erhöht. So erzielt man eine beeindruckende Trennung der drei oben eingesetzten fluoreszenzmarkierten Nukleotide aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen mit den durch dieses Detergenz gebildeten Micellen. In diesem Fall spricht man von einer micellaren elektrokinetischen Chromatographie (siehe Abschnitt 2.2.7.2). Allerdings bedingt die hohe Konzentration an Detergenz durch dessen Gegenion  $\text{Na}^+$  und der damit deutlich erhöhten Leitfähigkeit des Elektrolyten einen erheblichen Anstieg des Stromflusses auf  $\sim 70\mu\text{A}$ . Entsprechend Gleichung 2.10 (siehe Abschnitt 2.2.3.3) führt dieser hohe Stromfluß zu einer Erhöhung der elektrischen Leistung und somit zu einer Erhöhung der Jouleschen Wärme, wodurch sich die Trenneffizienz verringert. Eine Reduzierung der Jouleschen Wärme kann durch eine Erniedrigung der Trennungsspannung erreicht werden, die allerdings zu längeren, nicht praktikablen Analysenzeiten führen würde. Aus diesem Grund wurde die Konzentration des Puffers halbiert. Abbildung 71 zeigt die erzielten Ergebnisse für eine äquimolare Mischung (jeweils 60nM) aller vier fluoreszenzmarkierten Nukleosid-3'-phosphate **53-56**.

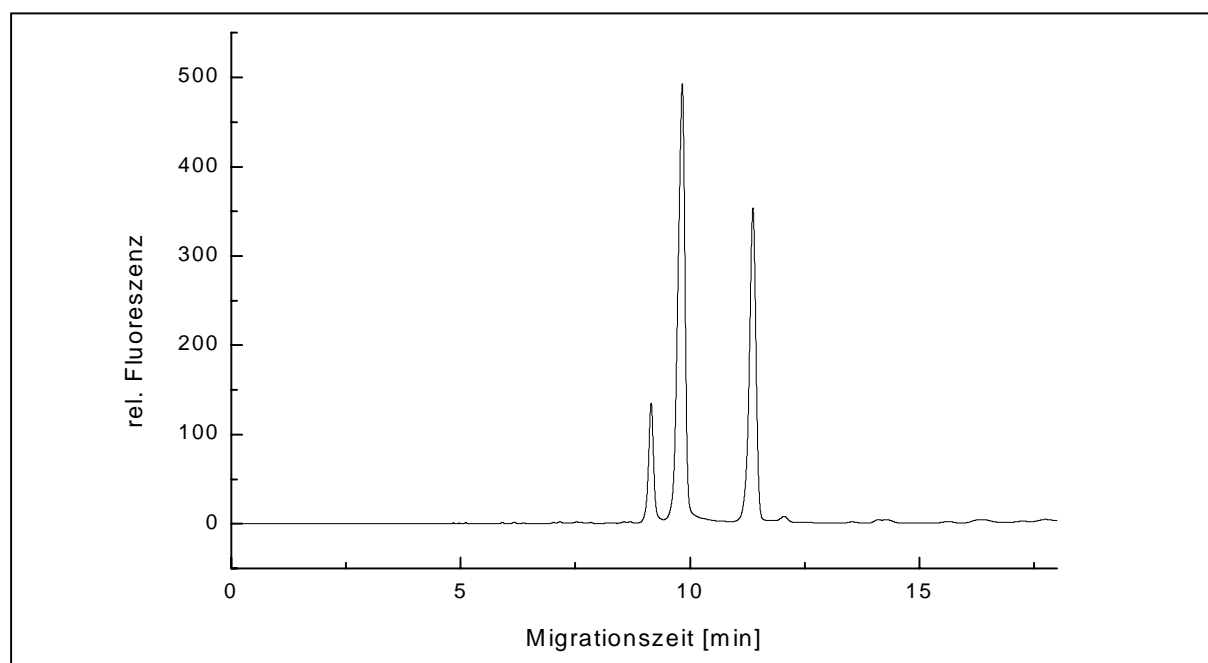


Abb. 71: Elektropherogramm der Trennung der vier BODIPY-markierten Nukleotide **53-56** mittels MEKC; Trennpuffer: 20mM Natriumphosphatpuffer, pH = 9,0, 50mM SDS

Die Reduzierung der Micellen im Elektrolyt führte zu deutlich kürzeren Analysenzeiten. Ferner verringerte sich der Stromfluß durch die geringere Ionenkonzentration auf  $\sim 36\mu\text{A}$ . Jedoch war eine vollständige Trennung aller vier Nukleotide unter diesen Bedingungen nicht möglich. Wie in Abschnitt 2.2.7.2 ausgeführt, ist die Wechselwirkung eines Analyten mit der



Micelle von entscheidender Bedeutung bei der MEKC. Diese Wechselwirkung kann durch die Zugabe organischer Modifier wie Acetonitril oder Methanol zum Elektrolyten beeinflusst werden, da sich dadurch die Lipophilie des Trennpuffers und die Hydrathülle der Analyten modifizieren läßt. Um eine vollständige Trennung zu erreichen, wurde daher die Selektivität des Elektrolyten durch Zugabe von Methanol gesteigert. Durch diese Methanol-Zugabe wurde die Lipophilie des Puffers erhöht und somit die Micellenbildung des SDS erschwert. Um dennoch eine ausreichende Micellenbildung sicherzustellen, mußte eine höhere SDS-Konzentration eingesetzt werden. Abbildung 72 zeigt die Trennung aller vier fluoreszenzmarkierten Nukleotide **53-56** mit einem Trennpuffer bestehend aus 10mM Natriumphosphat-Puffer, 100mM SDS und 15% Methanol, pH = 9,0.

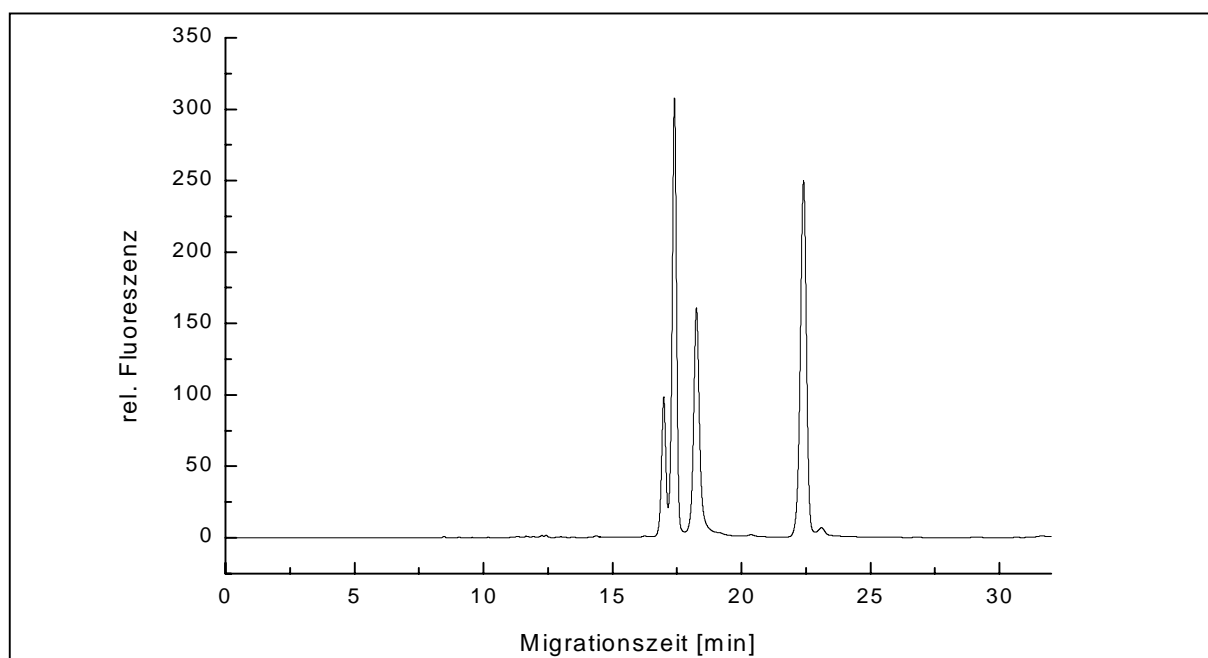


Abb 72: Elektropherogramm der Trennung der vier BODIPY-markierten Nukleotide **53-56** mittels MEKC; Trennpuffer: 10mM Natriumphosphatpuffer, pH = 9,0, 100mM SDS und 15% Methanol

Unter diesen Bedingungen wurde eine Antrennung aller vier Nukleotide erzielt. Somit konnte gezeigt werden, daß die Verwendung von Natriumphosphat-Puffer in Verbindung mit SDS als Micellenbildner und Methanol als organischer Modifier zur Trennung BODIPY-markierter Nukleotide geeignet ist. Die systematische Untersuchung verschiedener Konzentrationsverhältnisse von Natriumphosphat-Puffer, SDS und Methanol führte zu einem optimierten Trennelektrolyt, bestehend aus 17mM Natriumphosphat-Puffer, 75mM SDS, 15% Methanol, pH = 9,0. Abbildung 73 zeigt die vollständige Trennung einer äquimolaren Mischung (jeweils 60nM) aller vier 2'-Desoxynukleosid-3'-BODIPY-phosphoramidate **53-56**

mit dem optimierten Trennpuffer innerhalb von 20 Minuten. Die Zuordnung der Signale erfolgte dabei durch abwechselndes Aufstocken der Mischung mit den Einzelsubstanzen.

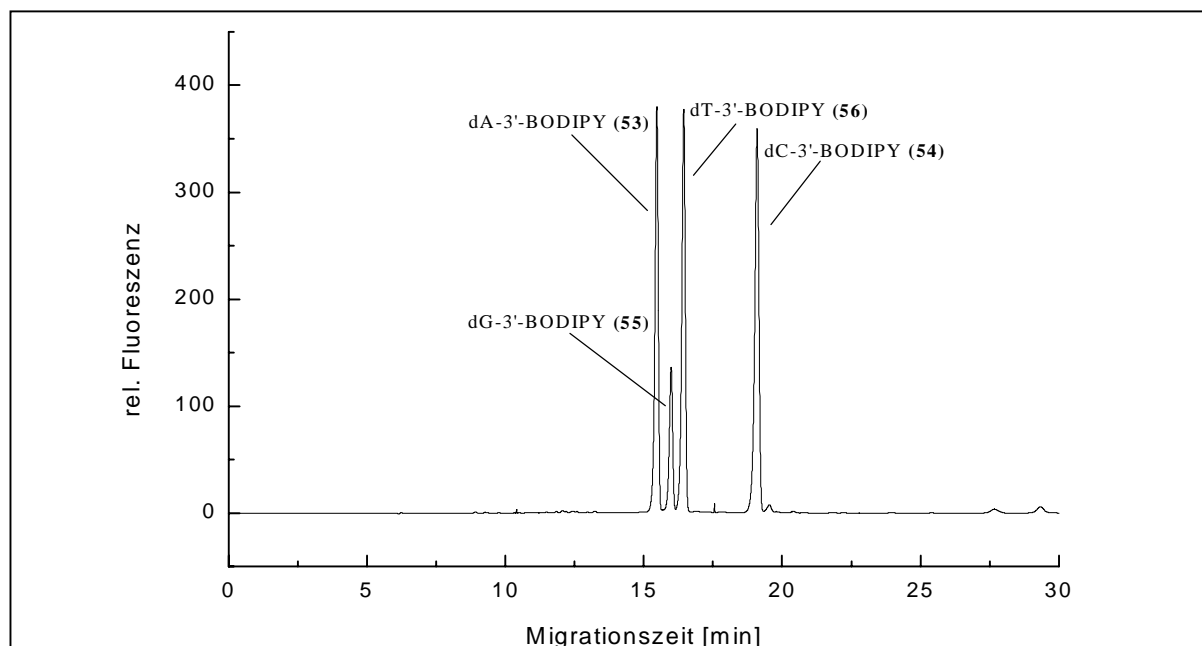


Abb 73: Elektropherogramm der Trennung der vier BODIPY-markierten Nukleotide **53-56** mittels MEKC; Trennpuffer: 17mM Natriumphosphatpuffer, pH = 9,0, 75mM SDS, 15% Methanol

Diese optimierten kapillarelektrophoretischen Parameter eignen sich auch für die Trennung der 2'-Desoxynukleosid-5'-BODIPY-phosphoramidate **49-52** (Abbildung 74).

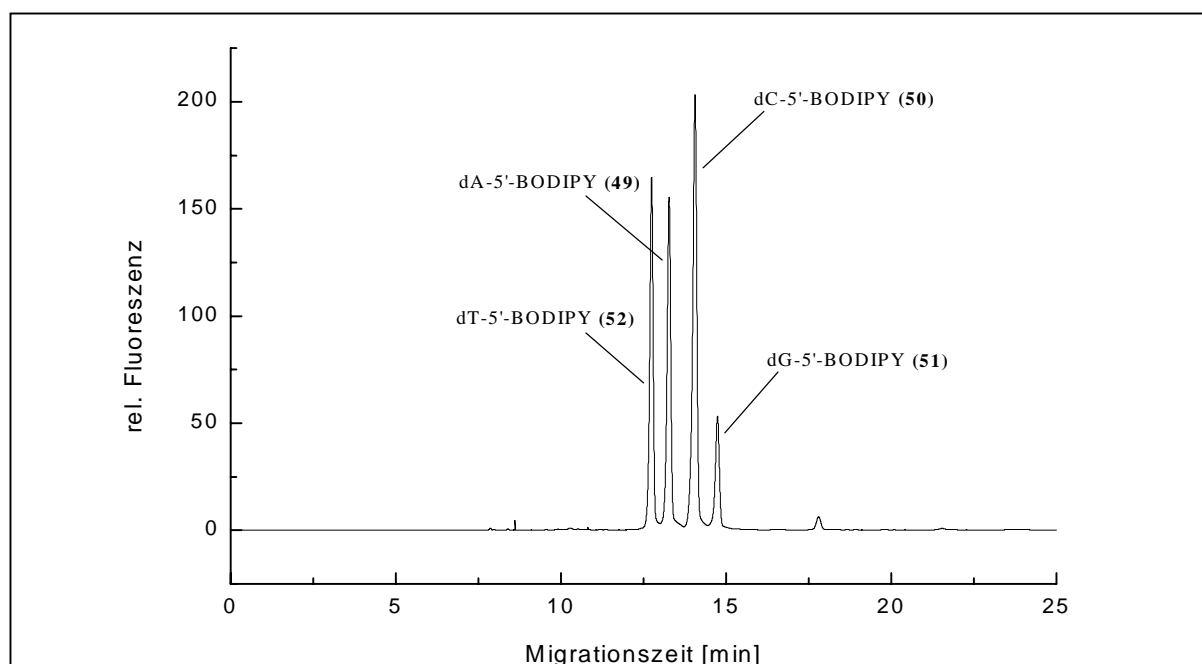


Abb. 74: Elektropherogramm der Trennung der vier BODIPY-markierten Nukleotide **49-52** mittels MEKC; Trennpuffer: 17mM Natriumphosphatpuffer, pH = 9,0, 75mM SDS, 15% Methanol

Interessanterweise ergibt sich unter gleichen kapillarelektrophoretischen Bedingungen für fluoreszenzmarkierte Nukleosid-5'-phosphate eine andere Elutionsreihenfolge als für die entsprechend derivatisierten 3'-Phosphate. Offensichtlich unterscheiden sich die beiden Klassen von Analyten in ihrer räumlichen Struktur in so großem Maß, daß verschiedene effektive Ladungsdichten resultieren oder sich unterschiedliche lipophile Wechselwirkungen mit der gebildeten Micelle ergeben. Unterschiedliche Verteilungskonstanten führen dann zu unterschiedlichen elektrophoretischen Gesamtmobilitäten. Aufgrund der deutlich geringeren Migrationszeit der derivatisierten Nukleosid-5'-phosphate kann man davon ausgehen, daß diese Verbindungen, bedingt durch eine größere Hydrathülle, eine geringere effektive Ladungsdichte besitzen und/oder hydrophiler sind und somit insgesamt weniger mit der Micelle wechselwirken. In Tabelle 6 sind die optimierten Trennparameter zusammengefasst:

<b>Analysenschritt</b>	<b>optimierte Bedingungen</b>
Kapillarelektrophorese	unbeschichtete fused-silica-Kapillare, $L_{\text{ges}} = 50\text{cm}$ , $L_{\text{eff}} = 45,4\text{cm}$ , Durchmesser = $50\mu\text{m}$ 20kV Trennungsspannung $\approx 400\text{V/cm}$ hydrodynamische Injektion $10\text{psi}\cdot\text{s}$ Trennpuffer bestehend aus $17\text{mM}$ Natriumphosphat-Puffer, $75\text{mM}$ SDS, $15\%$ Methanol, $\text{pH} = 6,5$

Tab. 6: optimierte Reaktionsbedingungen zur kapillarelektrophoretischen Trennung fluoreszenzmarkierter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate

#### 4.2.2 Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften BODIPY-markierter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate

Die Trennung einer äquimolaren Mischung aller vier fluoreszenzmarkierten 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate **53-56** (jeweils  $60\text{nM}$ ), dargestellt in Abbildung 73, zeigt anhand der Signalintensitäten, daß nicht alle vier Substanzen gleichermaßen stark Fluoreszenzphotonen emittieren. Offensichtlich fluoresziert das Guanosin-BODIPY-Konjugat deutlich geringer als die anderen Konjugate. Dieses Phänomen ist auch bei den entsprechenden 2'-Desoxynukleosid-5'-BODIPY-phosphoramidaten **49-52** zu beobachten (siehe Abbildung 74). Es ist bekannt, daß das Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen zu der Zahl der absorbierten Photonen, die sogenannte Fluoreszenzquantenausbeute [179], bei bestimmten Fluoreszenzmarkern deutlich umgebungsabhängig ist [123]. So verringert sich beispielsweise die Fluoreszenzquantenausbeute eines Fluoresceins durch Kopplung an ein

Protein um ~60%, während die Extinktion des Fluorophors nahezu unverändert bleibt [123]. Wichtige Faktoren, die die Fluoreszenzquantenausbeute eines organischen Farbstoffmoleküls beeinflussen können, sind ferner die Polarität des Solvens, die Konzentration fluoreszenzlöschender Agentien wie zum Beispiel paramagnetischer Sauerstoff oder schwere Atome wie Iodid, und der pH-Wert in wässrigen Medien [123]. Fluorescein ist beispielsweise ein klassischer Vertreter eines pH-abhängigen Farbstoffmoleküls. Aufgrund des  $pK_s$ -Wertes von ~ 6,4 der Hydroxylgruppe am Xanthensystem (siehe Abbildung 23, Abschnitt 2.3.1.1) reduziert sich die Fluoreszenzquantenausbeute durch die Abnahme der fluoreszenten, deprotonierten Form signifikant bei pH-Werten <7 [123]. Andere Mechanismen der Fluoreszenzlöschung beruhen auf bimolekularen Prozessen. So kann in Anwesenheit eines Löschmoleküls (Quencher) die Fluoreszenzintensität und –lebensdauer erheblich erniedrigt werden. Zu nennen sind hier die dynamische Löschung, die die Bildung eines Begegnungskomplexes zwischen Fluorophor und Löschmolekül während der Lebensdauer des Fluorophors im angeregten Zustand voraussetzt. Dabei geht der Fluorophor strahlungslos nach erfolgter Stoßlöschung (collisional quenching) in den elektronischen Grundzustand über [123]. Demgegenüber zeichnet sich die statische Löschung durch die Bildung eines Grundzustandskomplexes zwischen dem Fluorophor und dem Löschmolekül aus. Diese Grundzustandskomplexe fluoreszieren nicht oder nur sehr schwach.

Aufgrund der in Abbildung 73 und 74 gemachten Beobachtungen wurden die relativen Fluoreszenzquantenausbeuten der 2'-Desoxynukleosid-3'-BODIPY-phosphoramidate **53-56** bestimmt. Dazu wurden 1  $\mu$ M Lösungen der Verbindungen in dem verwendeten Trennpuffer hergestellt, um den Einfluß der Puffersubstanz und –additive zu berücksichtigen.

Die relativen Quantenausbeuten berechnen sich unter Berücksichtigung der Konzentrationsunterschiede nach:

$$(2.13) \quad rel.QA = \frac{\int (Fluoreszenzsignal)}{OD(\lambda_{ex})}$$

*rel. QA* = relative Fluoreszenzquantenausbeute;  $OD(\lambda_{ex})$  = optische Dichte der Substanz am Extinktionsmaximum;  $\int (Fluoreszenzsignal)$  = Integral des Fluoreszenzsignals der Substanz bei der Anregung am Extinktionsmaximum

Die auf diese Weise bestimmten relativen Fluoreszenzquantenausbeuten sind in Tabelle 7 dargestellt.

Verbindung	$\lambda_{\text{ex}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]	OD( $\lambda_{\text{ex}}$ )	$\int_{500-720}(\text{FS})$	rel. QA	normiert
3'-dA-BODIPY ( <b>53</b> )	495	516	0,0506	14338	283359,68	100%
3'-dC-BODIPY ( <b>54</b> )	495	516	0,0456	12632	277626,37	98%
3'-dG-BODIPY ( <b>55</b> )	495	516	0,0390	6106	156564,10	55%
3'-dT-BODIPY ( <b>56</b> )	495	516	0,0503	13783	274015,90	97%

Tab. 7: Darstellung spektroskopischer Eigenschaften BODIPY-markierter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate;  $\lambda_{\text{ex}}$  = Extinktionsmaximum;  $\lambda_{\text{em}}$  = Emissionsmaximum; OD( $\lambda_{\text{ex}}$ ) = optische Dichte der 1 $\mu$ M-Lösungen am Extinktionsmaximum;  $\int_{500-720}(\text{FS})$  = Integral des Fluoreszenzsignals von 500-720nm; rel. QA = relative Quantenausbeute nach 2.13;

Aufgrund der Daten aus Tabelle 5 wird deutlich, daß die relativen Fluoreszenzquantenausbeuten von BODIPY-markiertem Adenosin **53**, Cytidin **54** und Thymidin **56** gleich groß sind, während die Konjugation des BODIPY-Fluorophors an Desoxyguanosin beinahe zu einer Halbierung der Fluoreszenzintensität gegenüber den anderen Konjugaten führt. Dies erklärt unmittelbar die erhaltenen Signalintensitäten der kapillarelektrophoretischen Trennung in Abbildung 73. Aufgrund der Tatsache, daß die Fluoreszenzquantenausbeute aller vier Substanzen in der gleichen Pufferlösung bestimmt wurde, ist dieser Effekt der selektiven Löschung des 3'-dG-BODIPY-Konjugates durch dynamische oder statische Fluoreszenzlöschung nicht zu erklären. Vielmehr scheint dies durch spezielle Eigenschaften des Guanosins hervorgerufen zu werden. Eine solche basenabhängige Fluoreszenzlöschung wurde erstmals von *Seidel et al.* [180] für Coumarin-Farbstoffe beschrieben. Daß speziell Guanosin die Fluoreszenzeigenschaften auch von anderen Farbstoffklassen wie Rhodamine oder Oxazin-Derivate beeinflusst, wurde durch Arbeiten von *Sauer et al.* [181] bestätigt. Ein plausibler Mechanismus dieser basenabhängigen Fluoreszenzlöschung geht von einem photoinduzierten Elektronentransfer des Guanosin-Grundzustandes in den angeregten Singulett-Zustand des Fluorophors [182] aus. Dabei läßt sich die Sonderstellung des Guanosins als Elektronendonator durch sein niedriges Oxidationspotential im Vergleich zu den anderen Nukleotiden erklären [181,183]. Als Konsequenz dieser Fluoreszenzlöschung ergibt sich, daß eine absolute Quantifizierung fluoreszenzmarkierter Nukleotide ausschließlich aufgrund ihres Fluoreszenzsignals bei kapillarelektrophoretischen Trennungen nicht möglich ist. Dazu muß eine genaue Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute unter den Trennbedingungen durchgeführt werden. Übertragen auf die zu entwickelnde DNA-Addukt-Analytik bedeutet diese basenabhängige Fluoreszenzlöschung letztendlich, daß für jedes exakt zu

quantifizierende Addukt das entsprechende Fluoreszenzmarker-Konjugat synthetisiert und die spektroskopischen Eigenschaften experimentell bestimmt werden müssen, da die adduktspezifischen Basenmodifikationen die elektronische Struktur und somit das Oxidationspotential jeder Nukleobase beeinflussen können.

#### 4.2.3 Untersuchungen zur Sensitivität

DNA-Addukte kommen *in vivo* in sehr geringen Konzentrationen vor. Typischerweise findet man für exogene Kanzerogene 10 bis 1000 Addukte in einer Zelle. Für eine diploide Zelle mit ca.  $6 \cdot 10^9$  Nukleotiden ergibt sich somit ein Adduktlevel von 1 Addukt auf  $10^6$  bis  $10^8$  unmodifizierten Nukleotiden. Manche DNA-Modifikationen wie 5-Methylcytosin oder Spezies, die durch oxidativen Stress hervorgerufen werden wie zum Beispiel 8-Oxo-Guanosin, können aber auch in größeren Mengen vorkommen [184,185]. Verbunden mit der Tatsache, daß biologisches Material zur Gewinnung der DNA in der Regel nur in sehr geringem Maße zur Verfügung steht, stellt die DNA-Addukt-Analytik hohe Anforderungen an die Sensitivität der analytischen Methode.

Die Kapillarelektrophorese zeichnet sich durch sehr kleine Injektionsvolumina aus (siehe Abschnitt 2.2.5). Typischerweise betragen die aufgegebenen Volumina bei hydrodynamischer Injektion 1-50nl. Eine direkte experimentelle Bestimmung des Injektionsvolumens ist in solchen Größenordnungen nicht praktikabel. Allerdings kann die aufgegebene Flüssigkeitsmenge mathematisch unter Berücksichtigung der Viskosität der Lösung, des Kapillardurchmessers, der Kapillarlänge und des angelegten Druckes bestimmt werden (siehe Gleichung 2.11, Abschnitt 2.2.5). Diese kleinen Injektionsvolumina erweisen sich bei geringen Probenmengen als vorteilhaft. Andererseits stellt sie einen limitierenden Faktor der Sensitivität insbesondere bei verdünnten Proben dar. Die bislang in der Literatur beschriebenen Nachweisgrenzen fluoreszenzmarkierter Mononukleotide mittels Kapillarelektrophorese und Laser-induzierter Fluoreszenz-Detektion unterscheiden sich je nach Wahl der verwendeten Kopplungsstrategie und verwendeten Fluoreszenzmarker. So beschreibt *Lee et al.* beispielsweise für dansylierte 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphate eine Nachweisgrenze von 1nM, was bezogen auf das Injektionsvolumen einer Stoffmenge von 6attomol entspricht [186]. Die Arbeitsgruppe von *Roger W. Giese* ermittelte als Detektionslimit für Imidazol-konjugiertes BODIPY (siehe Abschnitt 2.3.2) 50pM [167]. Die beschriebene Nachweisgrenze für mit diesem Fluoreszenzmarker derivatisierte Mononukleotide beträgt 500fM [158] wobei eine spezielle Injektionsmethode, das sogenannte „Elektrostacking with reversed field“,

verwendet wurde. Bei dieser von *Chien* und *Burgi* [187,188] beschriebenen Methode wird ein Großteil des gesamten Kapillarvolumens mit Probe gefüllt und vor der Trennung durch Anlegen einer Spannung am Kapillaranfang fokussiert. Durch die deutlich größeren Injektionsvolumina (Mikroliter anstatt Nanoliter) können Sensitivitätssteigerungen bis Faktor 1000 erzielt werden. Voraussetzung sind jedoch salzfreie Proben, wodurch oftmals eine spezielle Probenvorbereitung notwendig wird

#### 4.2.3.1 Bestimmung der Nachweisgrenze BODIPY-markierter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate bei kapillarelektrophoretischen Trennungen

Nach der Entwicklung einer Derivatisierungsstrategie zur Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten und der Optimierung der kapillarelektrophoretischen Trennparameter, wurde das Detektionslimit mittels Laser-induzierter Fluoreszenz bestimmt. Zu diesem Zweck wurden verdünnte Lösungen der Mischung der vier fluoreszenzmarkierten Nukleotid-3'-phosphate **53-56** hergestellt und unter den in Abschnitt 4.2.1 optimierten Bedingungen kapillarelektrophoretisch getrennt. Nach *Kaiser* und *Specker* (Signal-Rausch-Verhältnis = 3:1) [189] ergaben diese Untersuchungen eine Nachweisgrenze für 2'-Desoxynukleosid-3'-BODIPY-phosphoramidate von 6pM (Abbildung 75).

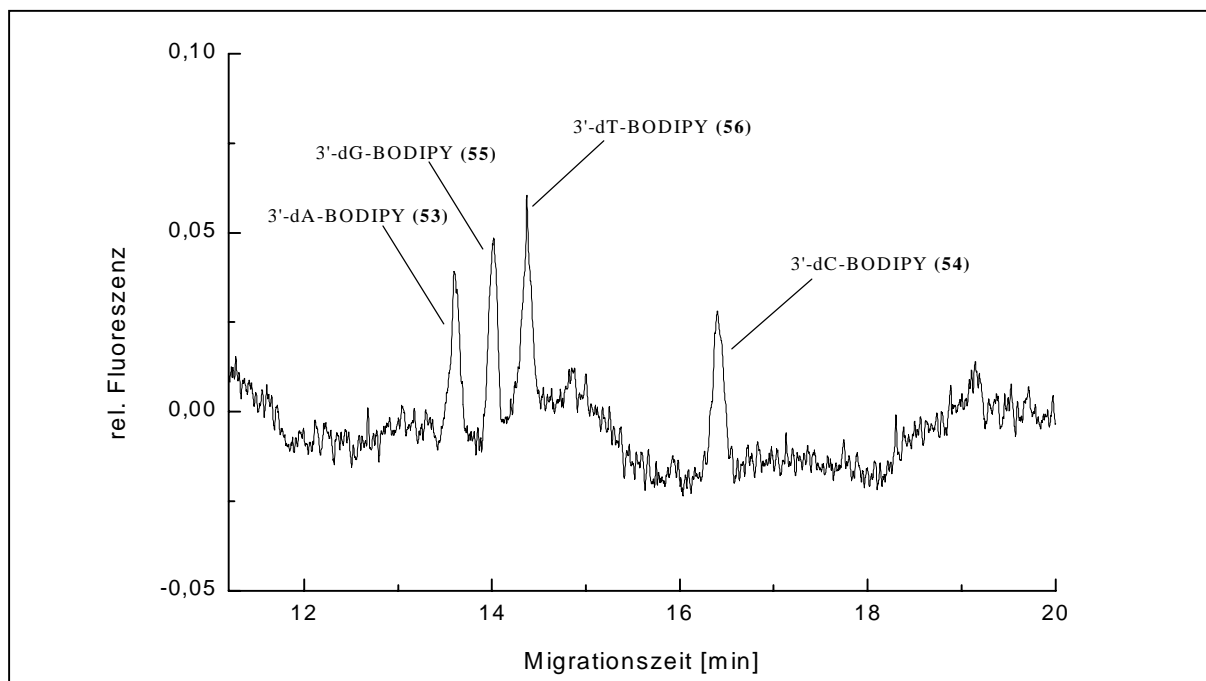


Abb. 75: Elektropherogramm einer jeweils 6pM Mischung aller vier 2'-Desoxynukleosid-3'-BODIPY-phosphoramidate **53-56**; Trennpuffer: 17mM Natriumphosphatpuffer, pH = 9,0, 75mM SDS, 15% Methanol

Unter den gegebenen analytischen Bedingungen – Kapillarlänge 50cm, Kapillardurchmesser 50µm, Injektionsdruck = 10psi·s, Viskosität ~1mP·s – errechnet sich das Injektionsvolumen zu ~20nL. Für eine 6pM Lösung ergibt sich somit eine aufgegebene Stoffmenge von ~120zeptomol.

Interessanterweise ist bei diesen geringen Konzentrationen kein Quenching des Fluoreszenzsignals von markiertem Desoxyguanosin zu beobachten. Die Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer ist stark von der räumlichen Nähe zwischen Fluorophor und Elektronendonator (in diesem Fall Guanin) abhängig und setzt sich aus einem inter- und intramolekularen Beitrag zusammen. Bei dem intramolekularen Elektronentransfer unterscheidet man je nach Beschaffenheit der Brücke zwischen Donor und Akzeptor zwischen „through bond“-Transfers (starre Struktur des Spacers, der als elektronischer Leiter betrachtet werden kann) und „through space“-Transfers (flexible Systeme wie Polymethylenbrücken). Während der intramolekulare Elektronentransfer konzentrationsunabhängig ist, wird der intermolekulare Beitrag (Stoßlöschung im angeregten Zustand, also binnen weniger Nanosekunden) stark durch die Konzentration des Elektronendonors beeinflusst. Dieser Prozeß spielt erst im millimolaren Bereich eine bedeutende Rolle. Aufgrund der in Abbildung 75 gemachten Beobachtung ist anzumerken, daß die basenspezifische, konzentrationsabhängige Fluoreszenzlöschung von BODIPY hauptsächlich ein bimolekularer Prozeß ist. Aufgrund der Aufkonzentration der Analyten bei der Kapillarelektrophorese während des Trennprozesses ist bei der Injektion von 60nM Lösungen damit zu rechnen, daß die Konzentrationen innerhalb der Probenzonen am Detektor deutlich höher sind, wodurch die beobachtete Fluoreszenzlöschung in Abbildung 74 und 75 erklärt werden kann. Bei der Injektion von 6pM Lösungen werden millimolare Konzentrationen innerhalb der Probenzone offensichtlich nicht erreicht, wodurch der Beitrag intermolekularer Fluoreszenzlöschung entfällt.

Welche Konsequenzen ergeben sich aus dieser Nachweisgrenze für die zu entwickelnde DNA-Addukt-Analytik? Bei der in Abschnitt 4.1.3.2 aufgeführten optimierten Fluoreszenzderivatisierung für 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate wird eine 1mM Nukleotidlösung mit jeweils dem gleichen Volumen an 25mM Fluoreszenzmarker und 300mM EDC zur Reaktion gebracht. Bei der Adduktanalytik werden typischerweise 10µg DNA eingesetzt und zu Mononukleotiden hydrolysiert. Bezogen auf das mittlere Molekulargewicht der vier Mononukleotid-3'-phosphate von 330g/mol entsprechen 10µg DNA ~30nmol Mononukleotide. Diese 30nmol Mononukleotide sollten entsprechend den erarbeiteten Reaktionsbedingungen in 30µl Puffer vorliegen. Durch die Zugabe von



Fluoreszenzmarker und EDC resultiert ein Gesamtvolumen von 90µl und einer Nukleotid-Konzentration von 330µM. Aufgrund der Nachweisgrenze von 6pM ergibt sich somit unter Annahme vollständiger DNA-Hydrolyse und quantitativer Fluoreszenzderivatisierung der erhaltenen Mononukleotide ein theoretisches Detektionslimit von 1 Addukt in  $6 \cdot 10^7$  unmodifizierten Nukleotiden.

#### 4.2.3.2 Diskussion des Detektionslimits fluoreszenzmarkierter Nukleotide

Das Detektionslimit für 2'-Desoxynukleosid-3'-BODIPY-phosphoramidate unter den in Abschnitt 4.2.1 entwickelten kapillarelektrophoretischen Trennbedingungen mittels Laser-induzierter Fluoreszenz von 6pM, respektive 120zeptomol, ist um den Faktor 10 niedriger als bei den bisher in der Literatur beschriebenen CE-LIF-Methoden [158,186,190]. Die sich daraus ergebende theoretische Nachweisgrenze für DNA-Addukte von  $\sim 1$  Addukt in  $6 \cdot 10^7$  unmodifizierten Nukleotiden liegt im Bereich der  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Standardmethode [100] (siehe Tabelle 1). Allerdings konnte durch spezielle Anreicherungsverfahren die Sensitivität dieser radioaktiven Methode um den Faktor 1000 gesteigert werden, so daß bis zu 1 Addukt in  $10^{10}$  unmodifizierten Nukleotide aus Mikrogramm-Mengen DNA nachweisbar sind [6,102]. Die anhand von Standardverbindungen ermittelte Sensitivität ist für einen allgemeinen Einsatz dieser Methode zur DNA-Addukt-Analytik nicht ausreichend, da man von deutlichen Beeinträchtigungen der Nachweisgrenze durch die Probenmatrix (Enzyme der DNA-Hydrolyse, Überschuß an Fluoreszenzmarker usw.) ausgehen muß. *Lee et al.* [186] beschreiben beispielsweise, daß trotz einer Nachweisgrenze von 1nM, respektive 7amol, durch einen großen Überschuß an Fluoreszenzmarker in der Derivatisierungsmatrix die Detektion von lediglich 1 Addukt auf  $1 \cdot 10^4$  unmodifizierten Nukleotiden unter den beschriebenen Bedingungen möglich sei. Eine ähnliche Nachweisgrenze bezogen auf die Stoffmenge erzielt *Sharma et al.* für den Nachweis von Cisplatin-Addukten aus enzymatisch hydrolysierter DNA [190].

Für einen empfindlicheren Nachweis von DNA-Addukten bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Als limitierender Faktor erweist sich das geringe Injektionsvolumen von  $\sim 20\text{nl}$ , respektive 1-2% des gesamten Kapillarovolumens, wodurch die absolut aufgetragene Menge an fluoreszenzmarkierten Nukleotiden stark begrenzt wird. Durch das „elektrostacking with reversed field“ nach *Chien und Burgi* [187,188] könnte durch das Ausnutzen des gesamten Kapillarovolumens zur Injektion eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 50 erzielt werden. Allerdings setzt dieses Vorgehen salzarme Probelösungen voraus. Somit müßten

Extraktionsverfahren entwickelt werden, die die Entsalzung der Derivatisierungsmatrix gestatten. Eine Möglichkeit, dieses zu erreichen, stellt eine entsprechende Festphasenextraktion nach erfolgter Fluoreszenzmarkierung dar. So wäre es denkbar, die Lipophilie des Fluoreszenzmarkers zur Anreicherung derivatisierter Nukleotide auszunutzen. Ferner könnte man durch die Verwendung einer Kapillare mit größerem Durchmesser (75µm statt 50µm) und der damit verbundenen Vergrößerung des Injektionsvolumens und des durch den Laser angeregten Probenvolumens eine weitere Sensitivitätssteigerung um den Faktor 2 - 4 erzielen. Allerdings ist dabei das Risiko einer schlechteren Wärmeabfuhr durch das ungünstigere Volumen/Oberflächen-Verhältnis und einer dadurch bedingten schlechteren Trennleistung zu bedenken. Desweiteren würde eine Reduktion des Reaktionsvolumens der Derivatisierung von 90µl auf beispielsweise 10µl die auf die Kapillare aufgegebene Stoffmenge deutlich erhöhen und ebenfalls zur Erniedrigung des Detektionslimits beitragen. Allerdings müßten dazu die entwickelten Reaktionsparameter an die geänderten Molaritäten angepasst werden. In diesem Zusammenhang könnten sich die Kopplungsraten von ca. 30% an fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durch die Überarbeitung der Reaktionsbedingungen erhöhen lassen. Denkbar wäre beispielsweise eine stufenweise Zugabe an Carbodiimid kombiniert mit einer die Hydrolyse des Aktivators vermindernenden niedrigeren Reaktionstemperatur.

#### **4.3 Fluoreszenzmarkierung enzymatischer DNA-Hydrolysate**

Nachdem eine Synthesestrategie, die die Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten in Wasser ermöglicht, und kapillarelektrophoretische Bedingungen zur Trennung und Detektion der dargestellten Substanzen entwickelt werden konnten, sollte dieses Konzept auf die Bedingungen der enzymatischen DNA-Hydrolyse übertragen werden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit sollte entsprechend dem radioaktiven <sup>32</sup>P-postlabeling-Verfahren vorgegangen werden und mittels Mikrokokkennuklease (MN) und Milzphosphodiesterase (SPD) DNA zu Mononukleosid-3'-phosphaten verdaut werden (siehe Abbildung 34). Die dadurch erhaltenen Hydrolysate sollten entsprechend der entwickelten Derivatisierungsstrategie fluoreszenzmarkiert und die Reaktionslösung kapillarelektrophoretisch untersucht werden.

### 4.3.1 Anpassung der DNA-Hydrolyse

Die Methode der enzymatischen DNA-Hydrolyse für das  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahren ist 20 Jahre nach der Vorstellung dieser Methode durch *Gupta et al.* [100] heutzutage standardisiert [90]. Typischerweise werden je Probe 12,5 µg trockene DNA in 6,5 µl Wasser gelöst, mit 1 µl Verdau-Puffer (250mM Natriumsuccinat, pH=6,0 und 100mM Calciumchlorid) und 5 µl Enzymlösung, bestehend aus 150mU/µl MN und 2,5mU/µl SPD versetzt. Dadurch erhält man Endkonzentrationen von 1 µg DNA/µl, 20mM Natriumsuccinat, 8mM Calciumchlorid, 60mU/µl MN und 1mU/µl SPD. Diese Lösung wird 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

In einem ersten Versuch wurden 12,5 µg Kalbsthymus-DNA (CT-DNA) nach dem oben beschriebenen Protokoll verdaut. Nach der Inkubation wurden 17,5 µl 100mM HEPES-Puffer, pH=6,5 zugegeben, so daß eine 1mM Konzentration an hydrolysierten Mononukleotiden entsprechend den in Abschnitt 4.1.3.1 aufgeführten optimierten Reaktionsbedingungen für die Fluoreszenzderivatisierung erhalten wurde. Diese 30 µl DNA-Hydrolysat wurden mit 30 µl 300mM EDC und 25mM BODIPY-EDA, jeweils in 100mM HEPES-Puffer, pH=6,5 umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde nach 16 Stunden mit Wasser verdünnt (1:10000) und unter den optimierten kapillarelektrophoretischen Bedingungen untersucht (Abbildung 76).

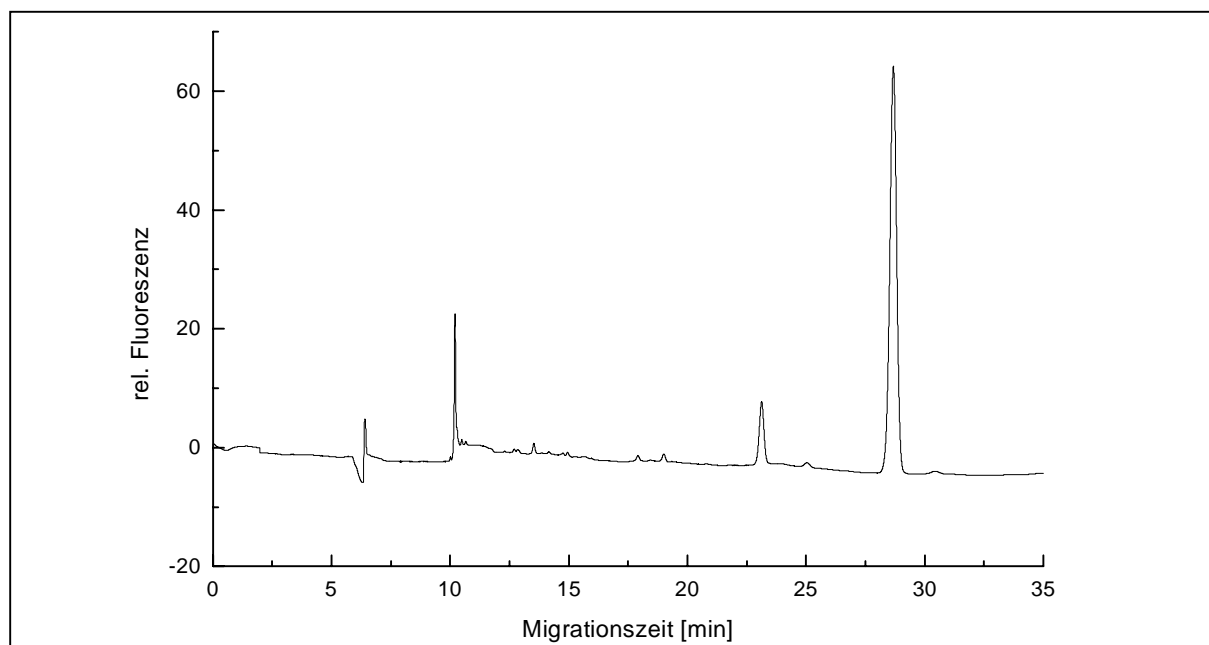


Abb. 76: Elektropherogramm der Fluoreszenzmarkierung eines enzymatischen CT-DNA-Hydrolysats nach der  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Standard-Methode [90]

Das Ergebnis in Abbildung 76 war enttäuschend, da kein Signal durch Aufstocken mit BODIPY-markierten Standardverbindungen identifiziert werden konnte. Offensichtlich

verhinderten entweder die Carbonsäuregruppen des Natriumsuccinats aus dem DNA-Hydrolyse-Puffer (siehe Abschnitt 4.1.3) oder die komplexe Matrix des DNA-Hydrolysates eine Markierung der Phosphatgruppen der Nukleotide. Um dies zu klären, wurde eine Mischung von jeweils 3 µg aller vier Nukleosid-3'-phosphate unter simulierten DNA-Hydrolyse-Bedingungen derivatisiert, wobei allerdings Natriumsuccinat als Puffersubstanz des DNA-Verdaus gegen HEPES gleicher Molarität und pH-Werte ersetzt wurde (Abbildung 77).

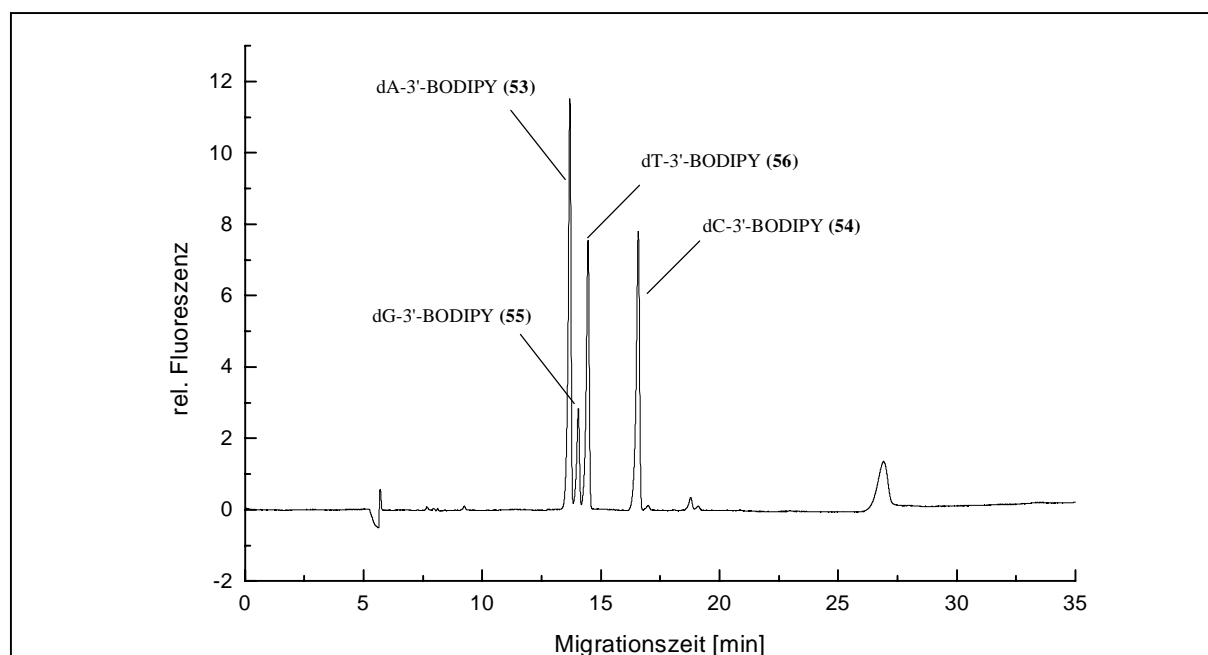


Abb. 77: Ausschnitt eines Elektropherogramms der Fluoreszenzmarkierung eines simulierten DNA-Verdaus einer Mischung aller vier Nukleosid-3'-phosphate mit HEPES als Puffersubstanz

Abbildung 77 zeigt, daß die Fluoreszenzmarkierung einer Mischung aller vier 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate in der komplexen Matrix der DNA-Hydrolyse erfolgreich abläuft. Das zusätzliche Fluoreszenzsignal bei etwa 27 Minuten ist vermutlich einem Abbauprodukt des Markers zuzuordnen. Die anhand isolierter Standardverbindungen entwickelten kapillarelektrophoretischen Bedingungen erweisen sich auch für eine Trennung der markierten Nukleotide aus der Derivatisierungsmatrix als geeignet. Aufgrund der hohen Lipophilie des eingesetzten BODIPY-EDA und der dadurch bedingten starken Wechselwirkung mit den Micellen eluiert der Markerüberschuß sehr spät (> 80min). Dadurch ergibt sich ein hinreichend großes micellares Fenster zur Detektion modifizierter Nukleotide (Abbildung 78).

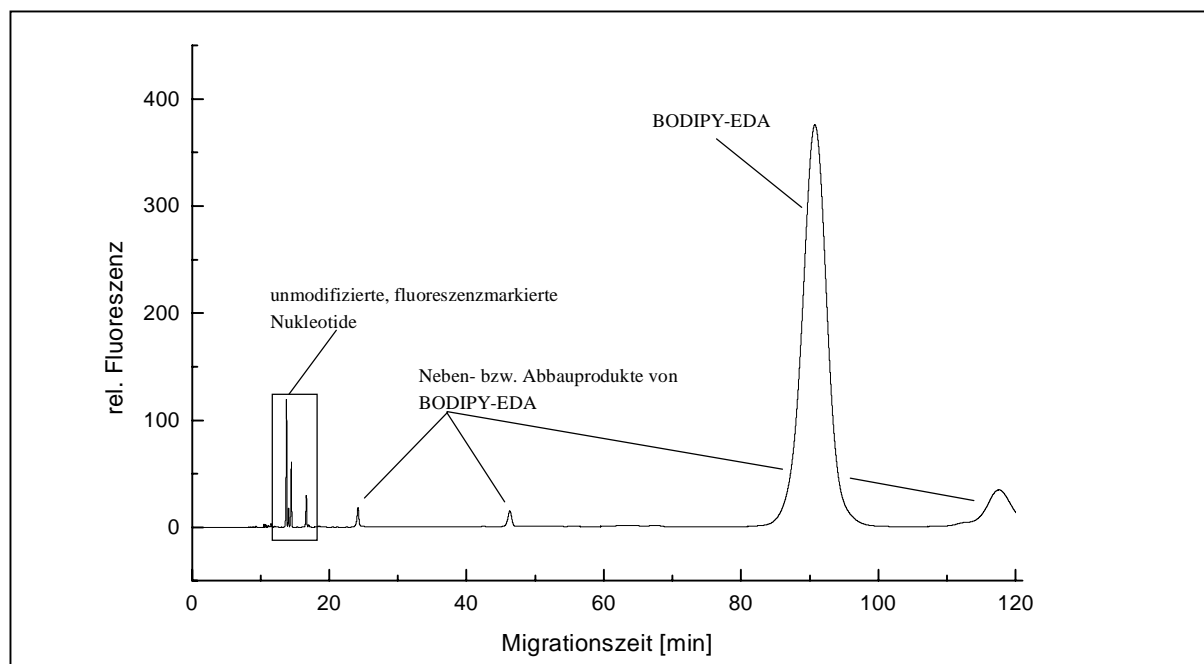


Abb. 78: Vollständiges Elektropherogramm der Fluoreszenzmarkierung eines simulierten DNA-Verdaus einer Mischung aller vier Nukleosid-3'-phosphate mit HEPES als Puffersubstanz

Die unterschiedlichen Signalintensitäten der einzelnen, fluoreszenzmarkierten Nukleotide bestätigen die bisher erzielten Ergebnisse. So wurde bereits anhand der Umsetzung der einzelnen Nukleotide mit BODIPY-EDA eine etwa 40% höhere Markierungseffizienz für 3'-dA gegenüber den restlichen Nukleotiden festgestellt (Tabelle 4). Erwartungsgemäß ist das Signal für 3'-dG-BODIPY aufgrund der basenspezifischen Fluoreszenzlöschung signifikant kleiner. Somit konnte gezeigt werden, daß die Hydrolyse-Enzyme in der Derivatisierungsmatrix die Fluoreszenzmarkierung nicht nennenswert beeinflussen. Demnach kann das enttäuschende Ergebnis der CT-DNA-Derivatisierung auf den Einsatz des Carbonsäurehaltigen Puffers zurückgeführt werden. Somit mußten die Bedingungen der DNA-Hydrolyse, sprich die verwendete Puffersubstanz, angepasst werden. Es galt zu klären, ob Natriumsuccinat bei der DNA-Hydrolyse durch HEPES ersetzt werden kann. Die Verwendung von HEPES würde eine direkte Umsetzung des DNA-Hydrolysats mit dem Fluoreszenzmarker ohne eine Zwischenreinigung der hydrolysierten Nukleotide zur Abtrennung des Succinats ermöglichen.

Diese Frage wurde mittels des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahrens beantwortet [90] (Abbildung 79). Dazu wurden jeweils 2 Proben à 12,5 µg CT-DNA nach der standardisierten Methode mit Natriumsuccinat-Puffer und HEPES-Puffer gleicher Molarität und pH-Wertes hydrolysiert. Als Kontrolle diente eine Mischung von jeweils 3,125 µg aller vier Nukleosid-3'-phosphate, die unter den gleichen Hydrolysebedingungen mit HEPES als Puffersubstanz umgesetzt

wurden. Diese Kontrolle simulierte den Fall vollständiger Hydrolyse. Nach 3stündiger Inkubation wurden Aliquots der Hydrolysate und Wasser als Negativkontrolle der Markierung mit jeweils 62,5µCi [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP mittels T4-Polynukleotidkinase radioaktiv markiert [191]. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die radioaktiv markierten Proben wurden nach Verdünnung [191] auf Polyethylenimin (PEI)-Cellulose-Fertigfolien aufgetragen und eindirektional mit einem entsprechenden Laufmittel (0,28M Ammoniumsulfat, 50mM Natriumphosphat, pH = 6,5) getrennt und autoradiographisch entwickelt (Abbildung 80). Die quantitative Auswertung der Radioaktivmarkierung erfolgte durch Messung der Zählraten der markierten Nukleotide in Abhängigkeit der in Bahn 1 gemessenen Hintergrundaktivität mit einem Phosphor-Imager. Die dabei ermittelten Werte (siehe Tabelle 8) zeigen deutlich, daß alle drei Radioaktivmarkierungen als gleichwertig zu betrachten sind. Dies bedeutet, daß die Verwendung von HEPES anstatt Natriumsuccinat als Puffersubstanz keine Beeinträchtigung der Effizienz der DNA-Hydrolyse mit sich bringt. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die Fluoreszenzmarkierung direkt an die DNA-Hydrolyse anzuschließen.

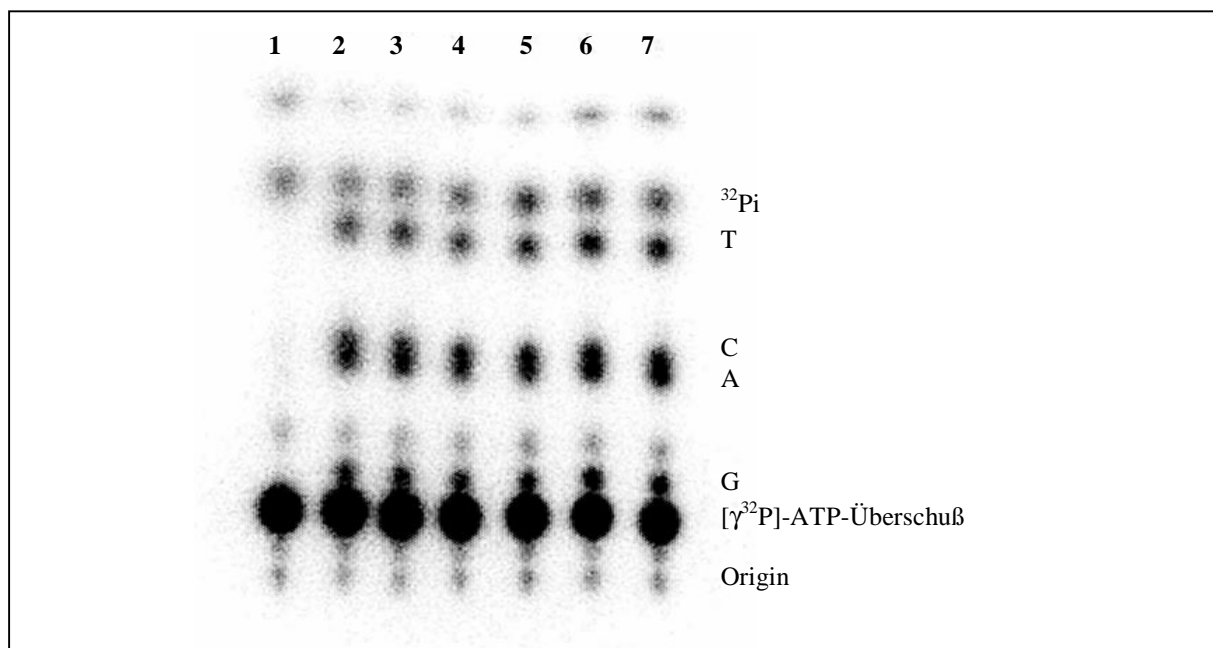


Abb. 79:  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Analyse unterschiedlicher DNA-Hydrolysate; **1**: Negativkontrolle mit Wasser; **2** und **3**: Standardhydrolyse mit Succinat; **4** und **5**: simulierte Hydrolyse von 3'-NMPs; **6** und **7**: modifizierte Hydrolyse mit HEPES; Origin = Auftragspunkt; G,A,C,T = radioaktivmarkierte Nukleosid-3'-5'-bisphosphate;  $^{32}\text{Pi}$  = freies, radioaktives Phosphat

Hydrolyse-Bedingungen	Netto-Radioaktivität [cpm]
Bahn 2 (CT-DNA; 250mM Natriumsuccinat, pH = 6,0)	12804
Bahn 3 (CT-DNA; 250mM Natriumsuccinat, pH = 6,0)	13879
Bahn 4 (3'-NMPs; 250mM HEPES, pH = 6,0)	11872
Bahn 5 (3'-NMPs; 250mM HEPES, pH = 6,0)	11833
Bahn 6 (CT-DNA; 250mM HEPES, pH = 6,0)	14500
Bahn 7 (CT-DNA; 250mM HEPES, pH = 6,0)	13222

Tab. 8: Quantitative Auswertung  $^{32}\text{P}$ -markierter Nukleosid-3'-phosphate nach DNA-Hydrolyse in verschiedenen Puffersystemen; cpm = counts per minute

In Tabelle 9 sind die angepaßten Hydrolyse-Bedingungen zusammengefaßt:

Analysenschritt	optimierte Bedingungen
DNA-Hydrolyse	12,5µg trockene DNA werden in 6,5µl Wasser gelöst + 6µl Verdau-Cocktail (250mM HEPES, pH = 6,0; 100mM $\text{CaCl}_2$ ; 150mU/µl MN, 2,5mU/µl SPD) Inkubation bei 37°C für 3h

Tab. 9: Für Fluoreszenzmarkierung angepaßte Bedingungen zur Hydrolyse genomischer DNA

#### 4.3.2 Kapillarelektrophoretische Untersuchung fluoreszenzmarkierter Nukleotide aus enzymatischer DNA-Hydrolyse

Die erfolgreiche Fluoreszenzmarkierung von Nukleosid-3'-phosphaten in der komplexen Matrix der DNA-Hydrolyse (Abbildung 77) und der erfolgreiche Verdau von Kalbsthymus-DNA mit HEPES als Puffersubstanz (Abbildung 78) ermöglichten nun die Überprüfung des gesamten erarbeiteten Konzeptes. Zu diesem Zweck sollte ein beliebiges Oligonukleotid unter den neuen Hydrolyse-Bedingungen verdaut und anschließend direkt fluoreszenzmarkiert werden. Diese Reaktionslösung sollte mittels kapillarelektrophoretischer Trennung und Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion analysiert werden. Das Oligonukleotid wurde unter folgenden, optimierten Bedingungen hydrolysiert, markiert und kapillarelektrophoretisch getrennt:

<b>Analysenschritt</b>	<b>Bedingungen</b>
DNA-Hydrolyse	10µg trockene DNA $\approx 3 \cdot 10^{-8}$ mol Nukleotide in 5,2µl Wasser + 4,8µl Verdau-Cocktail (250mM HEPES, pH = 6,0; 100mM CaCl <sub>2</sub> ; 150mU/µl MN, 2,5mU/µl SPD) Inkubation bei 37°C für 3h
Fluoreszenzmarkierung	10µl Hydrolysat + 20µl 100mM HEPES, pH = 6,5 ( $\approx 1$ mM Nukleotid) + 30µl 25mM BODIPY-EDA in 100mM HEPES, pH = 6,5 + 30µl 300mM EDC in 100mM HEPES, pH = 6,5 Inkubation bei 35°C für 16-24h
Kapillarelektrophorese (MEKC)	unbeschichtete fused-silica-Kapillare, $L_{\text{ges}} = 50\text{cm}$ , $L_{\text{eff}} = 45,4\text{cm}$ Durchmesser = 50µm 20kV Trennungsspannung $\approx 400\text{V/cm}$ hydrodynamische Injektion 10psi·s Trennpuffer bestehend aus 17mM Natriumphosphat-Puffer, pH = 6,5, 75mM SDS, 15% Methanol,

Tab. 10: Zusammenfassung der optimierten Bedingungen zur kapillarelektrophoretischen Analyse fluoreszenzmarkierter Nukleotide aus enzymatischer DNA-Hydrolyse

Als Oligonukleotid kam ein 20mer der Sequenz 5'-GAG.TCT.TCC.AGT.GTG.ATG.AT-3' (OLIGO 1) zum Einsatz, welches dankenswerterweise von Dr. Wolfgang Weinig, Abteilung F1000, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, zur Verfügung gestellt wurde. Abbildung 81 zeigt das Elektropherogramm der Reaktionslösung nach 16h Inkubationszeit. Die Reaktionslösung wurde vor der Injektion 1:10000 mit Wasser verdünnt, um sinnvolle Signalintensitäten der LIF-Detektion zu gewährleisten. Die Fluoreszenzsignale wurden durch Aufstocken mit den entsprechenden Standardverbindungen identifiziert. Aus Abbildung 80 wird ersichtlich, daß das erarbeitete Konzept der Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten aus enzymatischer DNA-Hydrolyse auf Oligonukleotide anwendbar ist und eine Basislinientrennung der derivatisierten Mononukleotide unter den beschriebenen Bedingungen aus der Derivatisierungsmatrix gelingt.



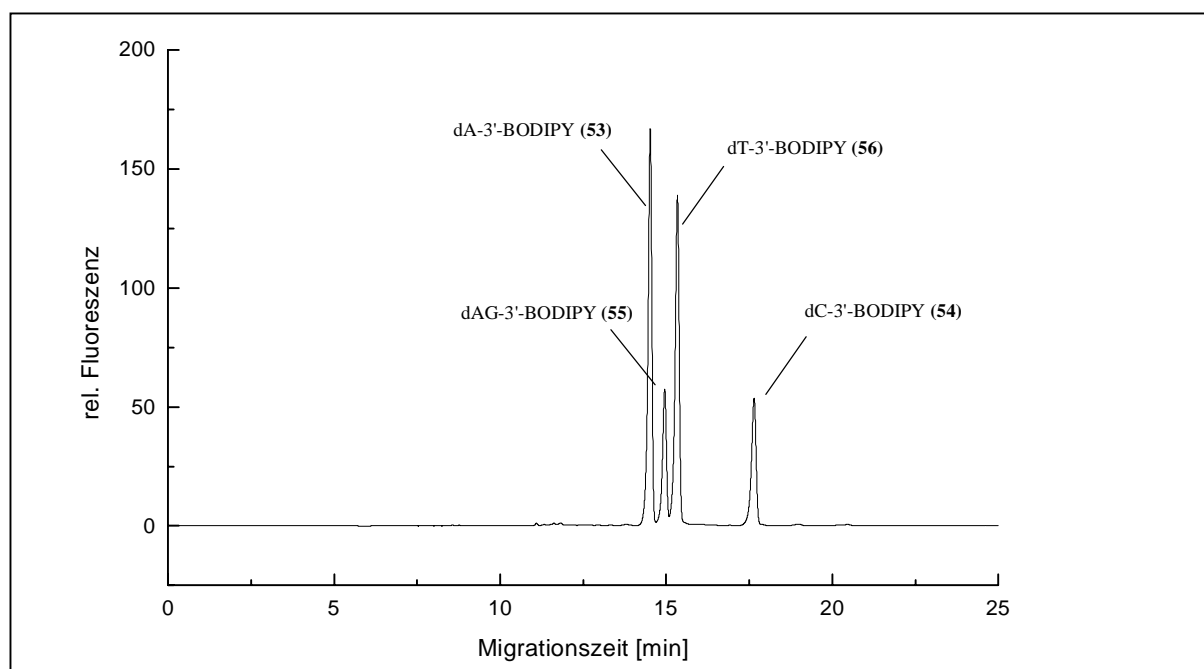


Abb. 80: Elektropherogramm des hydrolysierten, fluoreszenzmarkierten OLIGO 1

Die Fluoreszenzintensitäten bestätigen die bisherigen Ergebnisse. Das Oligonukleotid der Sequenz 5'-GAG.TCT.TCC.AGT.GTG.ATG.AT-3' setzt sich aus 20% Adenosin, 30% Guanosin, 35% Thymin und 15% Cytidin zusammen. Unter Berücksichtigung der relativen Quantenausbeute von 50% von markiertem Guanosin und einer um etwa 30% höheren Kopplungsausbeute für Adenosin spiegeln die Signalintensitäten den Gehalt an eingesetzten Nukleotide relativ gut wieder. Allerdings ist eine genaue Quantifizierung ausschließlich auf diesen Daten basierend nicht möglich (siehe Abschnitt 4.4.3).

Ein besonderer Vorteil der Methodik besteht darin, daß Proben direkt aus der Reaktionslösung vermessen werden und infolge dessen ein direktes Monitoring der Nukleotid-Verhältnisse erzielt wird. Allerdings wird dabei in eine mitunter noch nicht beendete chemische Reaktion eingegriffen. Ebenso muß der Einfluß der Verdünnung auf die Reaktionslösung geklärt werden. Aus diesen Gründen wurde einerseits der Verlauf der Signalintensitäten nach der Verdünnung als auch in der unverdünnten Reaktionslösung untersucht. Die in Abschnitt 4.1.3.1 anhand der Umsetzung von 5'-dA mit GLY erzielten Ergebnisse legen den Schluss nahe, daß die EDC-vermittelte Phosphoramidat-Bildung nach 15h beendet ist. Aufgrund der Schwierigkeiten beim Einsatz eines internen, fluoreszierenden Standards (Abbildung 65) ist ein direktes Monitoring des Reaktionsverlaufes nicht möglich. Um dennoch Informationen zu erhalten, ob die Derivatisierung der 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate nach 15h abgeschlossen ist, wurden nach 15 bis 22h Reaktionsproben entnommen, 1:10000 mit Wasser verdünnt und sofort mittels Kapillarelektrophorese gemessen. Die Signalintensitäten wurden

zur Bestimmung des relativen Nukleotid-Gehaltes auf das Signal von dA-3'-BODIPY (53) normiert (Abbildung 81). Somit fungierte dA-3'-BODIPY als interner Standard.

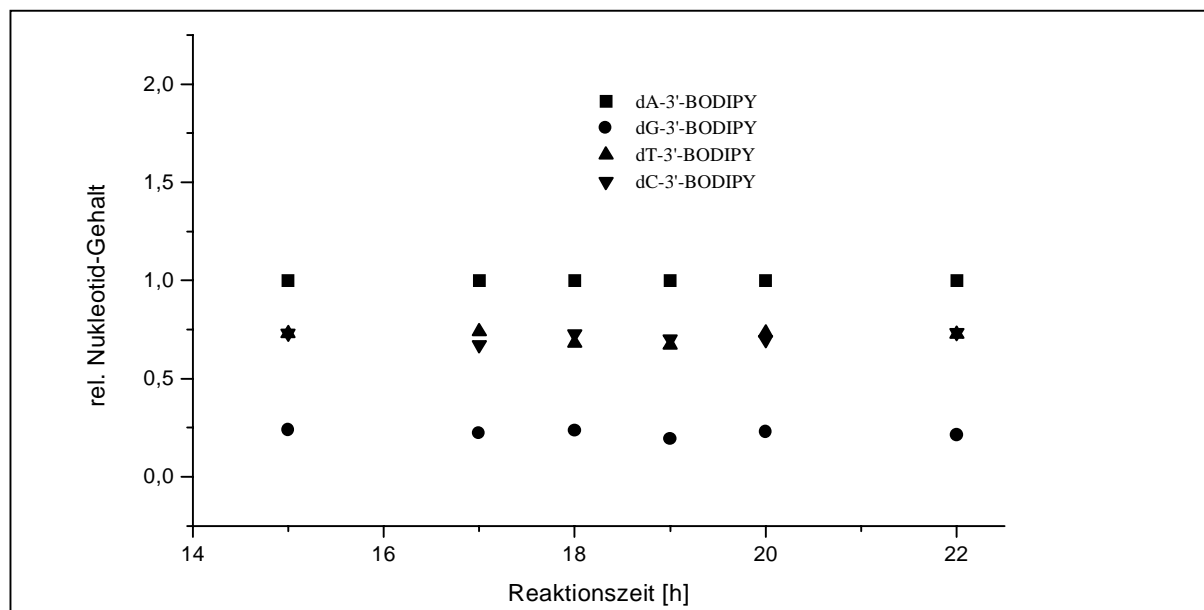


Abb. 81: Zeitlicher Verlauf von- auf dA-3'-BODIPY normierten Signalintensitäten fluoreszenzmarkierter Mononukleotide aus OLIGO 1

Die relativen Signalintensitäten zeigen, daß alle vier Nukleotide nach 15 Stunden im Rahmen der zu erzielenden Ausbeuten erschöpfend derivatisiert sind. Aufgrund der sich nach 15h kaum noch ändernden relativen Signalintensitäten ergibt sich ein hinreichend großer Spielraum im Laboralltag. Zur Untersuchung der Stabilität der verdünnten Verdünnung wurde die Derivatisierungslösung nach 15h einmalig 1:10000 mit Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde in zeitlichen Abständen kapillarelektrophoretisch vermessen und die Signalintensitäten graphisch aufgetragen. Die Daten in Abbildung 82 verdeutlichen, daß die Reaktionsmatrix durch die Verdünnung mit Wasser nachhaltig beeinflusst wird. Offensichtlich setzt nach dem Verdünnungsschritt eine starke hydrolytische Spaltung der gebildeten Konjugate ein, die innerhalb von 5 Stunden eine Halbierung der Signalintensitäten zur Folge hat, wobei sich die relativen Verhältnisse der markierten Nukleotide entsprechend der in Abbildung 81 dargestellten Daten nicht verändern.

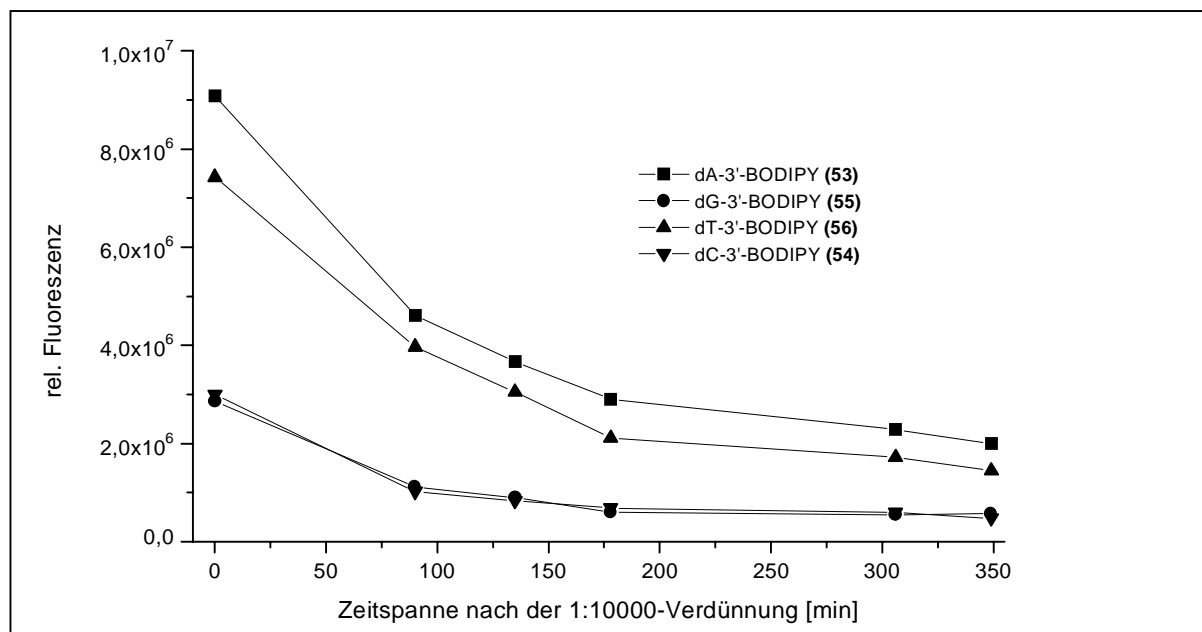


Abb. 82: Zeitlicher Verlauf der absoluten Signalintensitäten fluoreszmarkierter Nukleotide aus OLIGO 1 in einer 1:10000-Verdünnung mit Wasser

Als Schlußfolgerung aus diesen Untersuchungen wurde für alle folgenden Untersuchungen festgelegt, daß alle verdünnten Proben unverzüglich zu messen sind, wobei der Zeitpunkt der Entnahme der Probe zwischen 15 und 24h liegen sollte.

### 4.3.3 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit

Ein wichtiges Kriterium für die Bewertung einer analytischen Methode ist die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse. So leidet beispielsweise das <sup>32</sup>P-postlabelling-Verfahren unter der unterschiedlichen Beschaffenheit und der daraus resultierenden unterschiedlichen Trennleistung kommerziell erhältlicher PEI-Cellulose-Platten für die mehrdirektionale Dünnschichtchromatographie.

Anhand des synthetischen 20mers OLIGO 1 wurde die qualitative Reproduzierbarkeit der entwickelten Fluoreszenzmethode untersucht. Zu diesem Zweck wurden 3 Proben à 10µg OLIGO 1 an unterschiedlichen Tagen entsprechend den Bedingungen in Tabelle 10 untersucht. Darüber hinaus wurden bei der kapillarelektrophoretischen Trennung unterschiedliche fused-silica-Kapillaren verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 83 dargestellt.

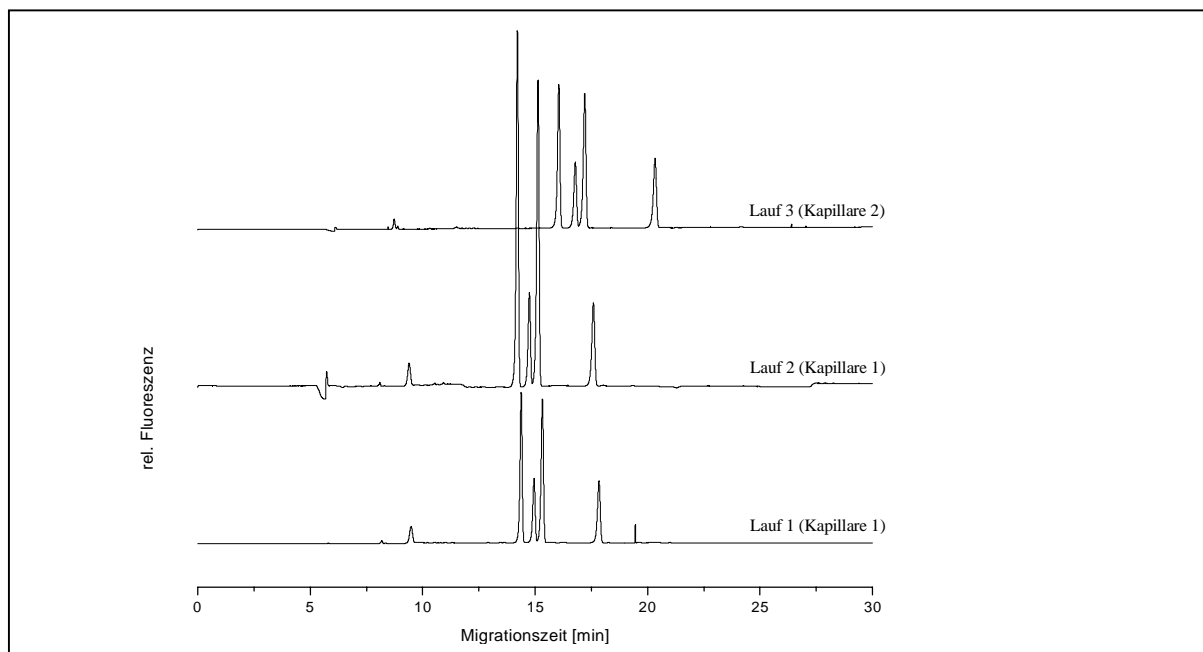


Abb. 83: Elektropherogramme unterschiedlicher Analysen von OLIGO 1 in unterschiedlichen Kapillaren

Die Elektropherogramme in Abbildung 83 zeigen, daß die Fluoreszenzmarkierung und kapillarelektrophoretische Trennung der derivatisierten Nukleotide in allen drei Analysen gleiche Ergebnisse liefert. Das in allen drei Analysen auftretende Signal bei ~9min ist auf ein Abbauprodukt des Fluoreszenzmarkers zurückzuführen. Die unterschiedlichen Signalintensitäten der drei Läufe sind in erster Linie der Varianz der hydrodynamisch injizierten Stoffmenge zuzuschreiben (siehe Abschnitt 2.2.5). Der Wechsel der Kapillare (Lauf 3) führt zu leicht verschobenen Migrationszeiten, wobei die Trennleistung jedoch voll erhalten bleibt.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die Fluoreszenzmarkierung und die Trennung mit der Kapillarelektrophorese reproduzierbare Resultate liefert. Insbesondere ermöglicht die Verwendung von nicht Oberflächen-behandelten, robusten fused-silica-Kapillaren nach entsprechender Konditionierung durch Spülen mit Natronlauge und Salzsäure eine qualitativ gleichbleibende Trennung. Dies ist ein bedeutender Vorteil gegenüber dem radioaktiven Postlabeling-Verfahren. Allerdings ist eine quantitative Auswertung ausschließlich aufgrund der Signalintegrale durch die Injektionsvarianz erschwert.

#### 4.3.4 Diskussion

Anhand der Hydrolyse eines synthetischen Oligonukleotids (OLIGO 1), der anschließenden Fluoreszenzmarkierung der Mononukleotide und deren kapillarelektrophoretischen Trennung

konnte der Beweis für die Trägfähigkeit des erarbeiteten Konzeptes für eine neue DNA-Addukt-Analytik erbracht werden. Dabei erwies sich die Kombination der getrennt voneinander optimierten Komponenten als sehr erfolgreich.

Durch den Einsatz von HEPES als Puffersubstanz wurde eine Durchführung der Fluoreszenzmarkierung im DNA-Verdau ermöglicht. Die anhand der Modell-Umsetzung von 5'-dA mit Glycinethylester gefundenen optimalen Reaktionsbedingungen eigneten sich für eine zuverlässige Derivatisierung der Mononukleotide des DNA-Hydrolysates. Bedeutend dabei ist, daß die Anwesenheit der Verdau-Enzyme die Kopplung des Fluoreszenzmarkers an die Nukleotide nicht nennenswert beeinflußt. Allerdings muß die Verbesserung der Kopplungseffizienz eine zukünftige Aufgabe sein.

Die Verwendung preiswerter und robuster unbeschichteter fused-silica-Kapillaren bei der anschließenden CE-Trennung erwies sich ebenfalls als geeignet. Diese Kapillaren gewährleisteten reproduzierbare Migrationszeiten durch die Verwendung von stark alkalischen Trennpuffern, ohne daß die Kapillarwand durch diese Puffer dauerhaft in Mitleidenschaft gezogen wird. Da unbeschichtete Kapillaren zwischen den Läufen mit Natronlauge und/oder Salzsäure gespült und somit rekonditioniert werden können, erhöht sich die Reproduzierbarkeit der Trennungen und Migrationszeiten, obwohl von erheblichen Wechselwirkungen der Kapillarwand mit den in der Probe befindlichen Enzymen ausgegangen werden muß. Eine Trennung ausschließlich aufgrund der unterschiedlichen Ladungsdichten der Probenkomponenten konnte nicht erzielt werden. Durch die Verwendung von SDS als Micellenbildner und Methanol als organischem Modifier konnte allerdings eine hinreichende Selektivität des Trennpuffers erzielt werden. Diese Selektivität erweist sich insbesondere im Hinblick auf die Lipophilie des im Überschuß eingesetzten Fluoreszenzmarkers als besonders geeignet, migriert dieser doch bedeutend langsamer als die markierten Nukleosid-phosphoramidate. Dadurch ergibt sich ein großes micellares Fenster über einen Zeitraum von mehr als einer Stunde, was die Detektion von lipophilen wie hydrophilen DNA-Modifikationen ermöglichen sollte.

Verbesserungswürdig ist die Empfindlichkeit der Methode. Die auf die Stoffmenge bezogene Sensitivität ist zwar um den Faktor 10 besser als entsprechende, bisher veröffentlichte Verfahren. Das „electrostacking with reversed field“ erweist sich dabei als mögliche Lösung, da dadurch das Injektionsvolumen um den Faktor 50 erhöht werden kann. Ferner ist eine direkte Quantifizierung der Probenkomponenten aufgrund der Signalintensitäten der LIF-Detektion erschwert. Zum einen erweist sich die Derivatisierung nicht für alle Nukleotide als gleichermaßen effizient, zum anderen wird die Fluoreszenz basenabhängig beeinflußt.

Darüber hinaus variiert die injizierte Probenmenge bei hydrodynamischer Probenaufgabe in beträchtlichem Maße.

#### **4.4 Analyse modifizierter Nukleotide aus synthetischen Oligonukleotiden und genomischer DNA**

Das erarbeitete Verfahren aus DNA-Hydrolyse, Fluoreszenzderivatisierung und kapillarelektrophoretischer Trennung der markierten Nukleotide sollte nun zur Analyse modifizierter Nukleotide angewendet werden. Zu diesem Zweck wurden definiert modifizierte, synthetische Oligonukleotide untersucht. Desweiteren wurde genomische DNA (CT-DNA und DNA isoliert aus Zellkultur sowie aus humanem Gewebe) analysiert. Anhand dieser Untersuchungen sollte abschließend eine Methode zur Quantifizierung modifizierter Nukleotide entwickelt werden.

##### **4.4.1 Analyse definiert modifizierter Oligonukleotide**

Die Verfügbarkeit kommerziell erhältlicher modifizierter Nukleotide als Phosphoramidite für die automatisierte Oligonukleotid-Synthese (siehe Abschnitt 2.3.1.2) ermöglichte die Darstellung definiert modifizierter Oligonukleotide, die als Surrogat für genomische DNA dienten.

Diese synthetischen Oligomere sind in vielfacher Hinsicht für die Entwicklung einer DNA-Addukt-Analytik besonders geeignet. So können die modifizierten Nukleotide in beinahe beliebiger Anzahl in das zu untersuchende Oligomer eingebaut werden, was die Zuordnung der Fluoreszenzsignale der DNA-Addukte im Vergleich mit einem unmodifizierten Oligonukleotid gleicher Sequenz bei der kapillarelektrophoretischen Trennung ermöglicht. Darüber hinaus sind diese Oligonukleotide aufgrund der automatisierten Synthese jederzeit und reproduzierbar verfügbar. Zudem simulieren Oligonukleotide die Verhältnisse für genomische DNA während des gesamten analytischen Prozesses hinreichend gut.

Als modifizierte Nukleotide kamen 5-Methyl-2'-desoxycytidin-3'-phosphat (5-Methyl-dC) als natürlich vorkommende DNA-Modifikation, etheno-dA (Abbildung 11) als Repräsentant ernährungsbedingter DNA-Addukte (siehe Abschnitt 2.1.3.2) und 8-oxo-dG (Abbildung 11) als Marker für oxidativen Stress (siehe Abschnitt 2.1.3.2) zum Einsatz. Die modifizierten, synthetischen Oligonukleotide wurden von *Wolfgang Weinig*, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, hergestellt.

#### 4.4.1.1 Untersuchung 5-Methyl-dC-modifizierter Oligonukleotide

Anhand verschiedener Oligonukleotide mit unterschiedlichen 5-Methyl-dC-Gehalten wurde der Einfluß von 5-Methylcytidin auf das Signalmuster der kapillarelektrophoretischen Trennung untersucht. In Tabelle 11 sind die eingesetzten Nukleotide zusammengefasst.

Bezeichnung	Größe	Sequenz	dC : 5-Methyl-dC
OLIGO 1	20mer	5'-GAG.TCT.TCC.AGT.GTG.ATG.AT-3'	/
OLIGO 2	20mer	5'-GAG.TCT.TC*C*.AGT.GTG.ATG.AT-3'	1 : 2
OLIGO 3	22mer	5'-AAC.AC*T.TTT.C*BA.TAG.TGT.GAC.G-3'	1 : 1

Tab. 11: Eingesetzte Oligonukleotide zur Untersuchung von 5-Methyl-dC (C\*)

Der direkte Vergleich des unmodifizierten OLIGO 1 (Abbildung 83) mit dem 5-Methyl-dC-modifizierten OLIGO 2 zeigt ein zusätzliches Signal im Elektropherogramm in Abbildung 84.

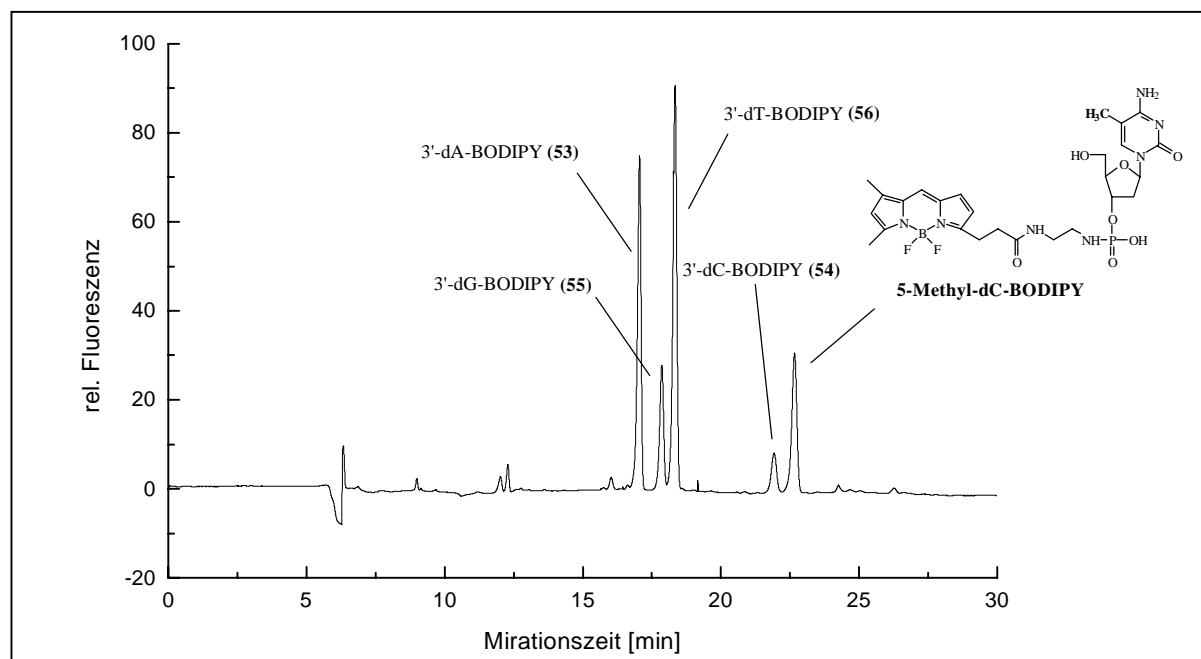


Abb. 84: Elektropherogramm des hydrolysierten, fluoreszenzmarkierten OLIGO 2

Durch Aufstocken der Probe des modifizierten OLIGO 2 mit der Standardverbindung 3'-dC-BODIPY (54) wurde das Signal bei ~22min als markiertes unmodifiziertes dC identifiziert. Folglich ist das Signal bei ~23min fluoreszenzmarkiertes 5-Methyl-dC, was durch die Signalintensitäten von ~ 1 : 2 entsprechend dem Verhältniss von dC zu 5-Methyl-dC bestätigt wird.

Die Theorie von MEKC-Trennungen besagt (siehe Abschnitt 2.2.7.2), daß Analyten mit zunehmender Lipophilie aufgrund der zunehmenden Wechselwirkung mit den Micellen später eluieren, während Analyten mit abnehmender Ladungsdichte früher den Detektor passieren. Daß fluoreszenzmarkiertes 5-Methyl-dC langsamer als fluoreszenzmarkiertes dC migriert, läßt somit den Schluß zu, daß die Zunahme der Lipophilie gegenüber der abnehmenden Ladungsdichte durch die zusätzliche Methylgruppe dominiert.

Somit konnte anhand dieses Versuches erstmals ein modifiziertes Nukleotid neben den unmodifizierten Normals durch Fluoreszenzmarkierung und kapillarelektrophoretischer Trennung mit LIF-Detektion sicher nachgewiesen werden.

#### 4.4.1.2 Untersuchung etheno-dA-modifizierter Oligonukleotide

Entsprechend der für den Nachweis von modifiziertem Cytidin erfolgreichen Vorgehensweise wurden etheno-dA-modifizierte Oligonukleotide untersucht. Die Identifizierung des etheno-dA-Signals erfolgte dabei wieder durch den Vergleich eines modifizierten Oligonukleotids mit dem entsprechenden unmodifizierten Oligomer (Tabelle 12).

Bezeichnung	Größe	Sequenz	dA : etheno-dA
OLIGO 1	20mer	5'-GAG.TCT.TCC.AGT.GTG.ATG.AT-3'	/
OLIGO 5	20mer	5'-GAG.TCT.TCC.A*GT.GTG.ATG.AT-3'	3 : 1

Tab. 12: Eingesetzte Oligonukleotide zur Untersuchung von etheno-dA (A\*)

Das Elektropherogramm in Abbildung 85 zeigt den Vergleich von OLIGO 1 mit dem etheno-dA-modifizierten OLIGO 5. Aufgrund des Vergleichs des unmodifizierten OLIGO 1 mit dem etheno-dA-modifizierten OLIGO 5 kann das Signal bei ~11,5min fluoreszenzmarkiertem etheno-dA zugeordnet werden. Auffällig ist, daß das Signal für unmodifiziertes dA in OLIGO 1 bezogen auf das dT-Signal größer ist, während in OLIGO 5 aufgrund des Wegfalls eines unmodifizierten dA das Signal kleiner ist als dT.



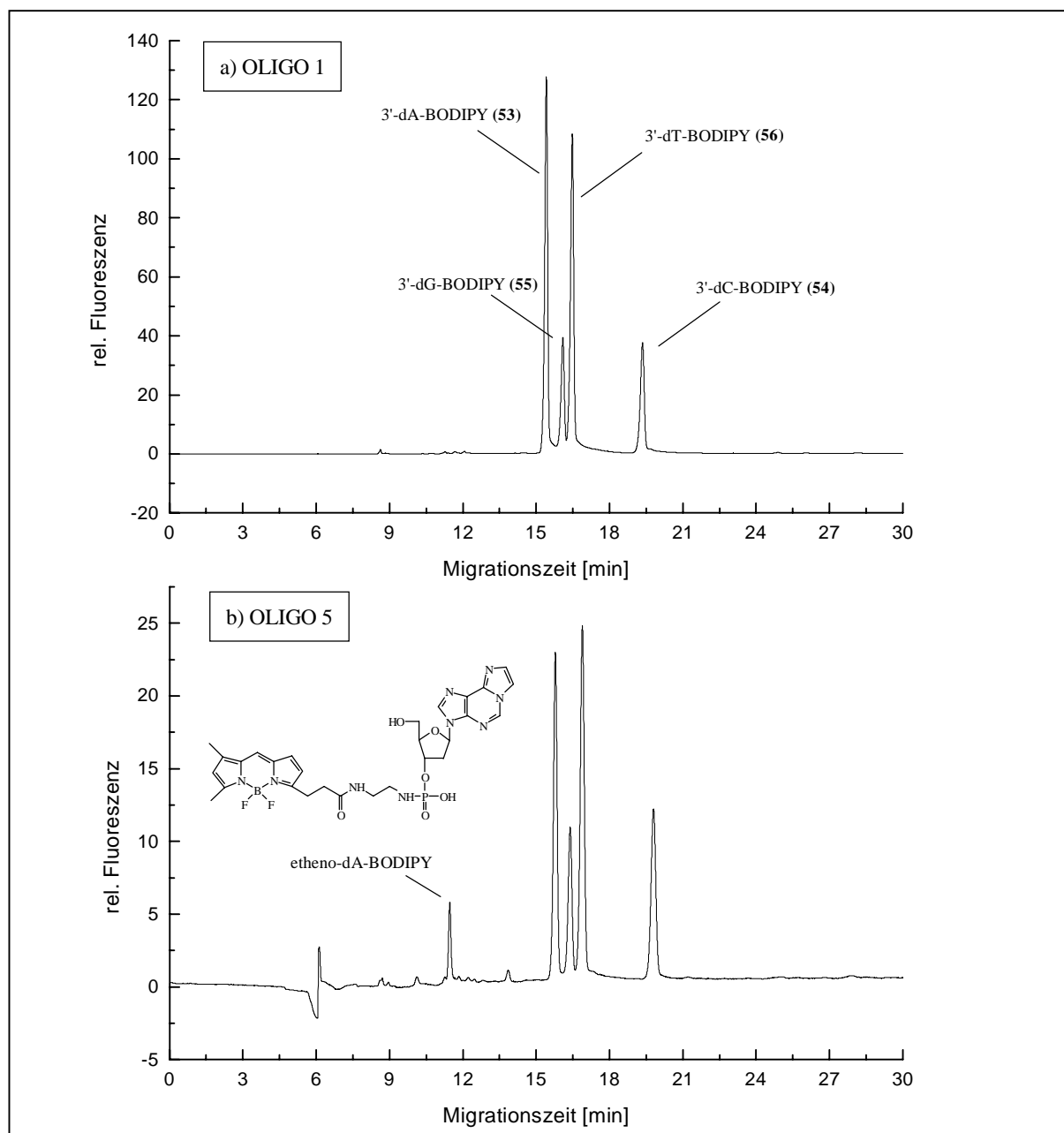


Abb. 85: Elektropherogramme der hydrolysierten, fluoreszenzmarkierten OLIGO 1 und OLIGO 5

Das Migrationsverhalten von fluoreszenzmarkiertem etheno-dA ist sehr interessant. Obwohl durch die Etheno-Gruppe die Lipophilie zunehmen sollte, migriert es deutlich schneller im Vergleich zu unmodifiziertem 3'-dA-BODIPY. Darüber hinaus ist eine Zunahme der Ladungsdichte durch den Verlust der unter den Trennbedingungen protonierten freien exozyklischen Aminogruppe zu erwarten. Dadurch sollte sich die negative Gesamtladung von fluoreszenzmarkiertem etheno-dA gegenüber fluoreszenzmarkiertem 3'-dA-BODIPY erhöhen, was eine deutlich langsamere Migration zur Kathode zur Folge haben sollte.

Eine mögliche Erklärung ist, daß überwiegend eine Wechselwirkung mit der negativ geladenen hydrophilen Micellenoberfläche anstatt mit deren lipophilem Kern vorliegt [115].

Somit könnte der Verlust einer positiven Partialladung einer überwiegend als hydrophil zu betrachtenden Substanz zu einer reduzierten Wechselwirkung und somit zu einer beschleunigten Migration führen.

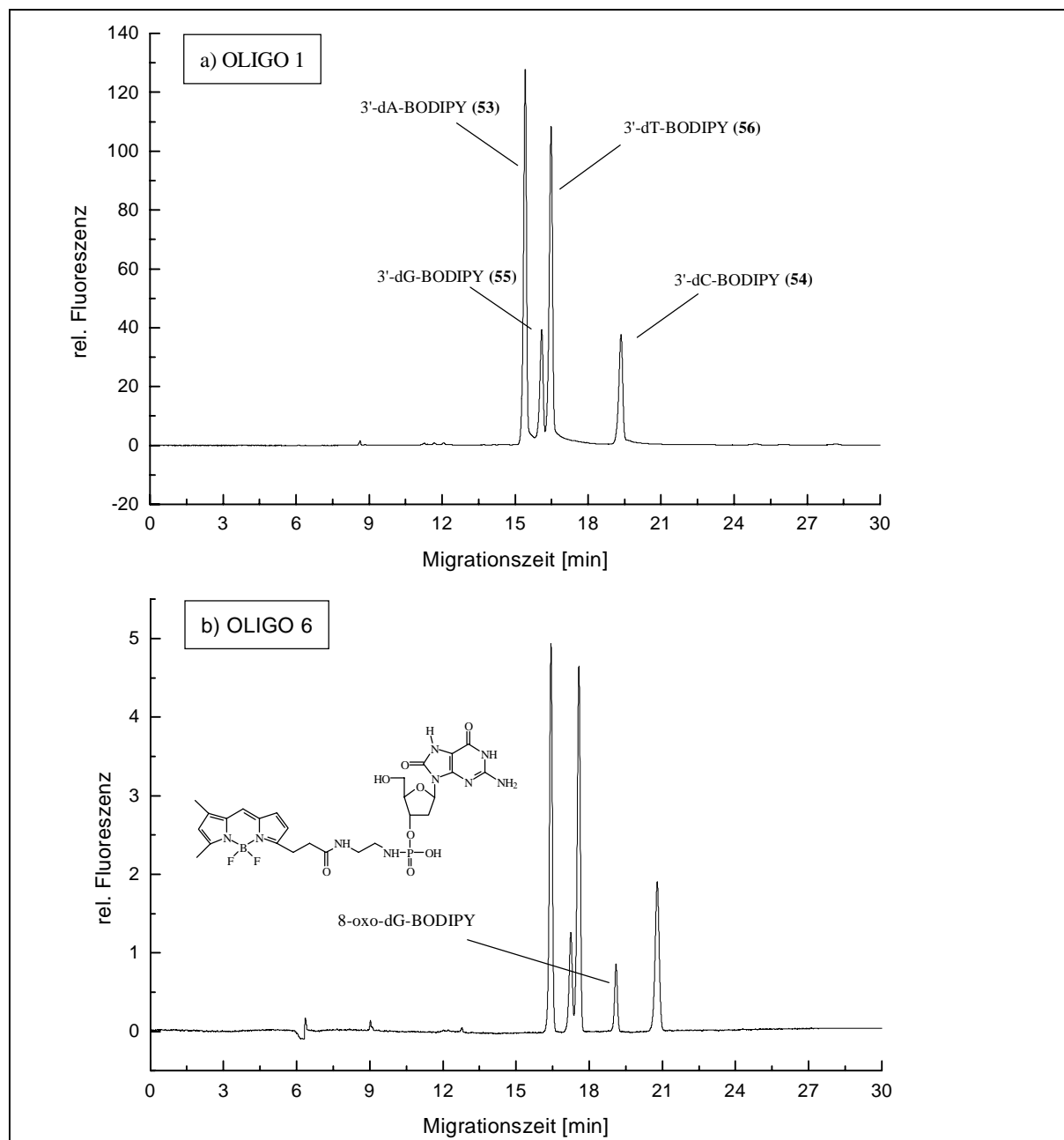
#### 4.4.1.3 Untersuchung 8-oxo-dG-modifizierter Oligonukleotide

Oxidative DNA-Schädigungen spielen in der Karzinogenese eine bedeutende Rolle [61]. So lassen epidemiologische Untersuchungen den Schluß zu, daß die Ernährung zu etwa 35% zum Krebsrisiko beiträgt [192]. Allerdings ist im Vergleich zu dem Gehalt an direkten Karzinogenen der Anteil an krebspräventiven Antioxidantien wie Vitamin C und E oder Carotinoiden und Flavonoiden für den ernährungsbedingten Beitrag des Krebsrisikos von größerer Bedeutung [193]. Der am häufigsten untersuchte Biomarker für oxidative Schädigungen ist 8-Oxo-7,9-dihydro-2'-desoxyguanosin-3'-phosphat (8-oxo-dG) [185]. Allerdings zeichnen sich die verwendeten Analyse-Methoden für die Bestimmung von 8-oxo-dG aus humanen Proben wie HPLC mit elektrochemischer Detektion (ECD) oder Gaschromatographie mit gekoppelter massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) durch extreme Varianzen um bis zu Faktor 1000 des detektierten 8-oxo-dG-Gehalts aus [185]. Offensichtlich ist gerade diese DNA-Modifikation für artifizielle Veränderungen durch die analytische Methode (Anwesenheit von Sauerstoff, Silylierung zur MS-Detektion etc) ausgesprochen empfindlich [185,194].

Aufgrund dieser Sensitivität von 8-oxo-dG gegenüber artifizieller Veränderungen war es besonders interessant, anhand entsprechend modifizierter Oligonukleotide zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit entwickelte Methode die Detektion dieser Modifikation ermöglicht. Die eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 13 dargestellt.

Bezeichnung	Größe	Sequenz	dG : 8-oxo-dG
OLIGO 1	20mer	5'-GAG.TCT.TCC.AGT.GTG.ATG.AT-3'	/
OLIGO 6	20mer	5'-GAG.TCT.TCC.AGT.G*TG*.ATG.AT-3'	2 : 1

Tab. 13: Eingesetzte Oligonukleotide zur Untersuchung von 8-oxo-dG (G\*)



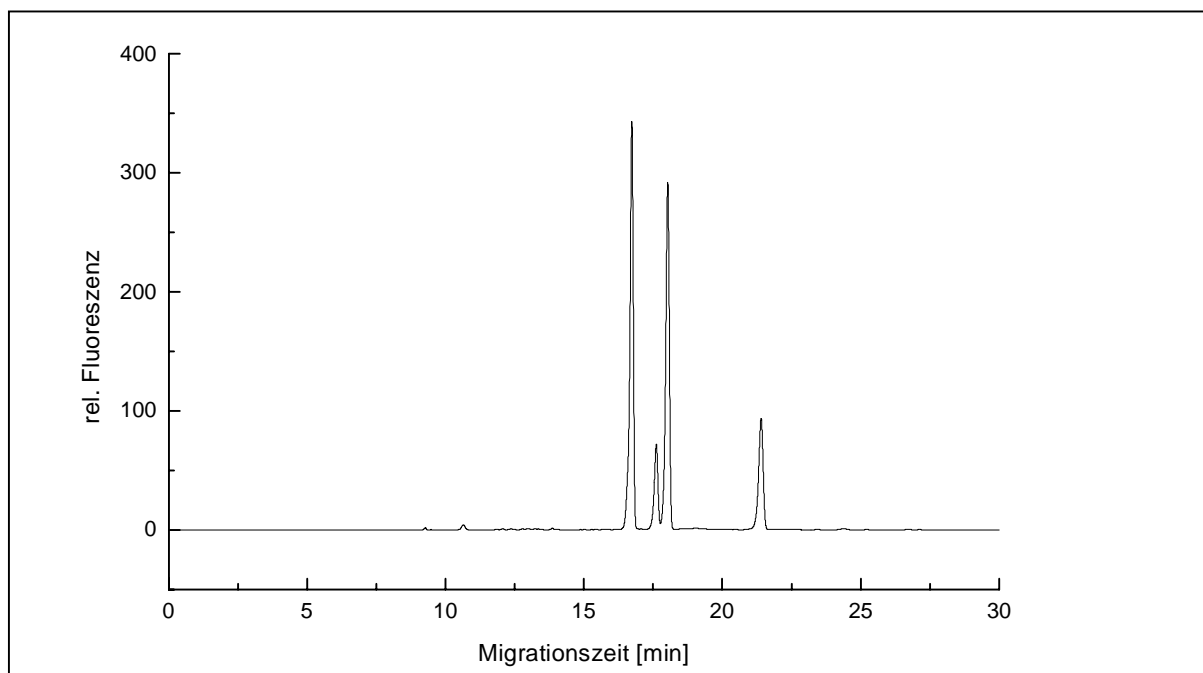


Abb. 87: Elektropherogramm des hydrolysierten, fluoreszenzmarkierten OLIGO 6 16h nach Reaktionsabbruch

Das Elektropherogramm in Abbildung 87 weist kein Signal für fluoreszenzmarkiertes 8-oxo-dG mehr auf. Offensichtlich ist diese Modifikation in der komplexen Derivatisierungsmatrix nicht stabil. Da der relative Anteil an 3'-dG-BODIPY gegenüber den anderen Normals gleichbleibt, ist eine Umwandlung von 8-oxo-dG zu unmodifiziertem 3'-dG auszuschließen. Eine mögliche Erklärung für das Verschwinden des 8-oxo-dG-Signals ist die Bildung sogenannter „apurinic sites“ durch Depurinisierung oder „apyrimidinic sites“ durch Depyrimidinisierung, wie sie insbesondere für N7- und C8-Desoxyguanosin-Addukte beschrieben ist [195-197]. Der Mechanismus der Abspaltung der Base von der Desoxyribose geht dabei von einer Schwächung der N-glykosidischen Bindung durch eine Protonierung der Base aus, die durch labile Addukte an N7 oder C8 erleichtert ist. Durch diesen Mechanismus könnte der Verlust an fluoreszenzmarkiertem 8-oxo-dG in der Reaktionslösung bedingt sein. Als Produkt dieser spontanen Depurinisierung würde ein fluoreszenzmarkiertes 2'-Desoxyribose-3'-phosphat entstehen, welches sich in seinen Migrationseigenschaften deutlich von dem ursprünglichen Nukleotid unterscheiden sollte. Allerdings konnte ein entsprechendes Signal bislang nicht sicher zugeordnet werden, wenngleich sich in mehreren Versuchen eine Schulter am 3'-dA-BODIPY-Signal bildete, welche ausschließlich bei der Untersuchung von 8-oxo-dG-modifizierten Oligonukleotiden zu beobachten war.

Dennoch stellt das entwickelte Verfahren eine Möglichkeit zur Detektion dieses wichtigen Biomarkers dar, wobei allerdings die strenge Einhaltung der Reaktionsdauer und des Zeitpunkts der Messung für reproduzierbare Ergebnisse unabdingbare Voraussetzung ist.

#### 4.4.2 Analyse unmodifizierter genomischer DNA

Nachdem anhand von synthetischen Oligonukleotiden gezeigt werden konnte, daß das entwickelte Verfahren zum Nachweis von unmodifizierten und modifizierten Nukleotiden geeignet ist, sollte die Anwendbarkeit der Methode für die Analyse genomischer DNA untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde kommerziell erhältliche CT-DNA und aus humanem Gewebe isolierte DNA, die von *Heinz H. Schmeiser*, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, zur Verfügung gestellt wurde, untersucht. Entsprechend dem Analysenprotokoll in Tabelle 10 wurden jeweils 10 µg trockene DNA analysiert. Zur kapillarelektrophoretischen Trennung wurden die Proben 1:10000 mit Wasser verdünnt, um integrierbare Signale der LIF-Detektion zu gewährleisten. Abbildung 88 zeigt die Analyse der CT-DNA.

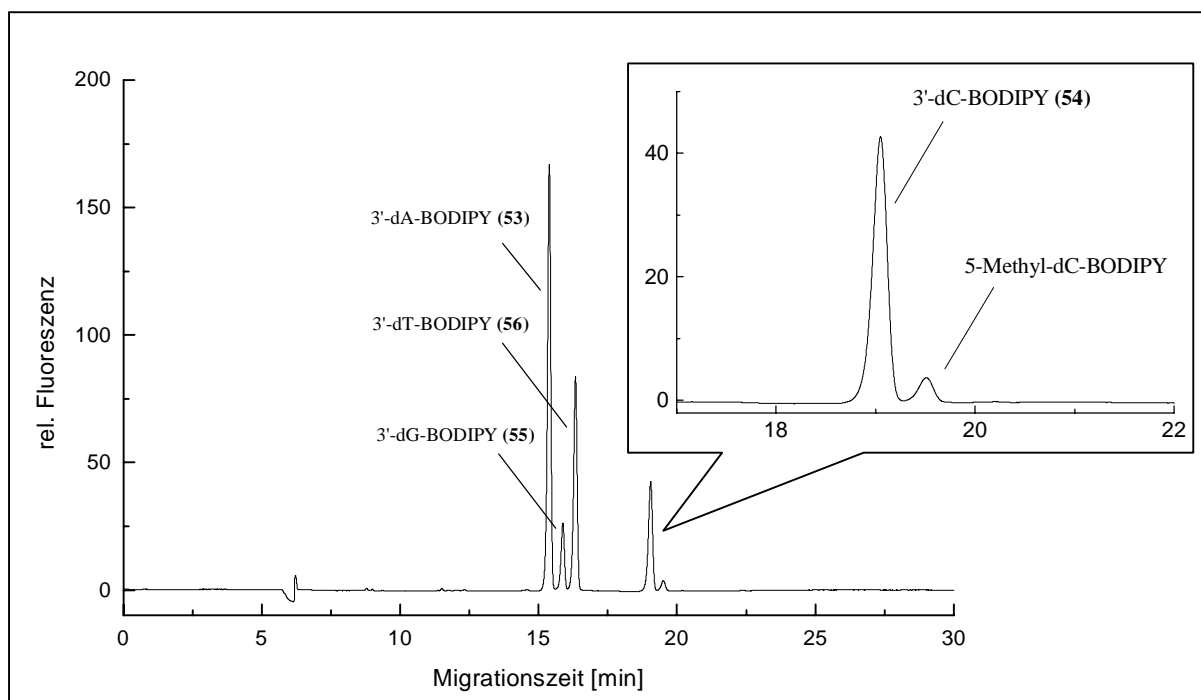


Abb. 88: Elektropherogramm hydrolysierter, fluoreszenzmarkierter CT-DNA

Die Analyse von CT-DNA liefert fünf Signale. Die Identifikation der fluoreszenzmarkierten unmodifizierten Nukleotide erfolgte durch Aufstocken mit Standardverbindungen, während 5-Methyl-dC-BODIPY durch Aufstocken der CT-DNA-Probe mit entsprechend behandeltem OLIGO 2 zugeordnet wurde. Das Elektropherogramm zeigt eindrucksvoll, daß die Übertragung der Methodik auf genomische DNA ohne weitere Veränderung erfolgreich ist. Durch diese Untersuchungen konnte erstmals eine reale DNA-Modifikation mittels dem neu entwickelten Verfahren nachgewiesen werden. Geht man von einer gleichermaßen effizienten

Markierung von 3'-dC und 5-Methyl-dC aus, so ergibt sich aus dem Verhältnis der Integrale der Fluoreszenzsignale, daß ~ 8% aller Cytosine methyliert in der CT-DNA vorliegen. Dieser Methylierungsgrad ist konsistent mit den in der Literatur beschriebenen 5-Methyl-dC-Anteilen von 3-10% [71-73].

Die Reproduzierbarkeit der Analyse genomischer DNA wurde anhand der Zugabe eines internen Standards zur Probelösung untersucht. Da man nach einer Reaktionszeit von 16h von einer vollständigen Zersetzung an aktivierendem Carbodiimid ausgehen kann (siehe Abschnitt 4.1.3.1), ist eine Beeinflussung der Reaktionsmatrix durch einen Carbonsäure-haltigen Fluoreszenzmarker ausgeschlossen. Als interner Standard erwies sich eine 100nM Fluorescein-Lösung sowohl von der Signalintensität als auch vom Migrationsverhalten als geeignet (Abbildung 89).

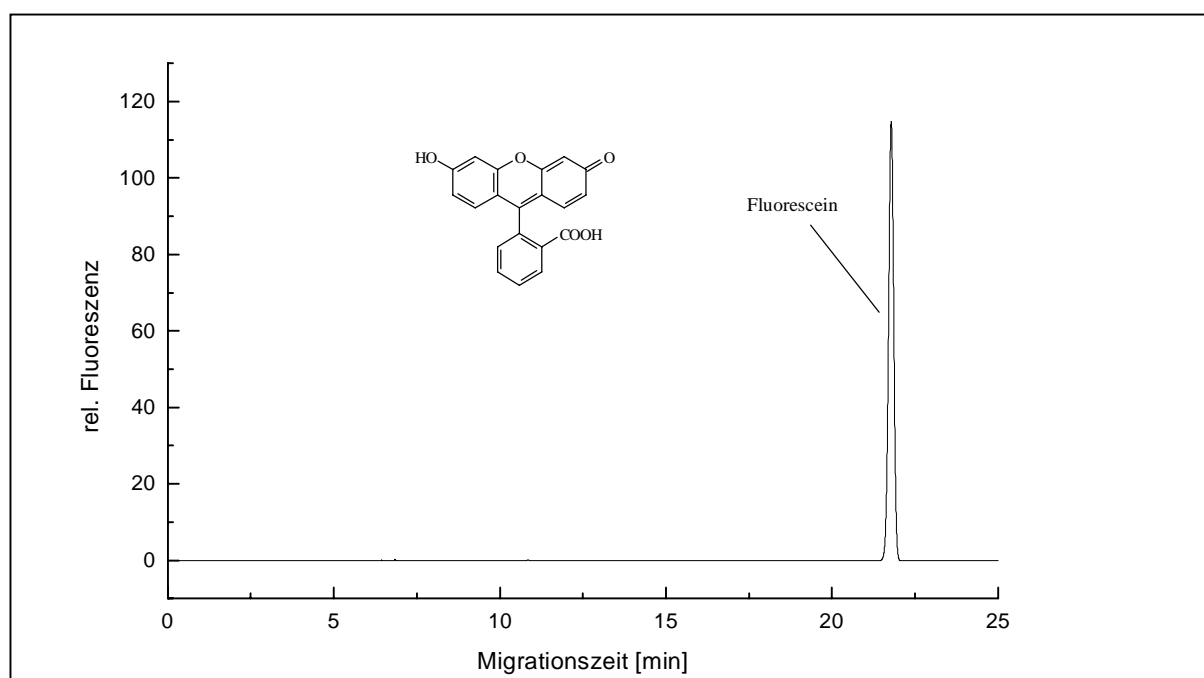


Abb. 89: Elektropherogramm einer 100nM Fluorescein-Lösung

Zwei CT-DNA-Proben à 10µg wurden separat an verschiedenen Tagen hydrolysiert und fluoreszenzderivatisiert. Nach 16h wurde jeweils ein Aliquot 1:10000 mit einer 100nM Fluorescein-Lösung verdünnt und kapillarelektrophoretisch untersucht (Abbildung 90).

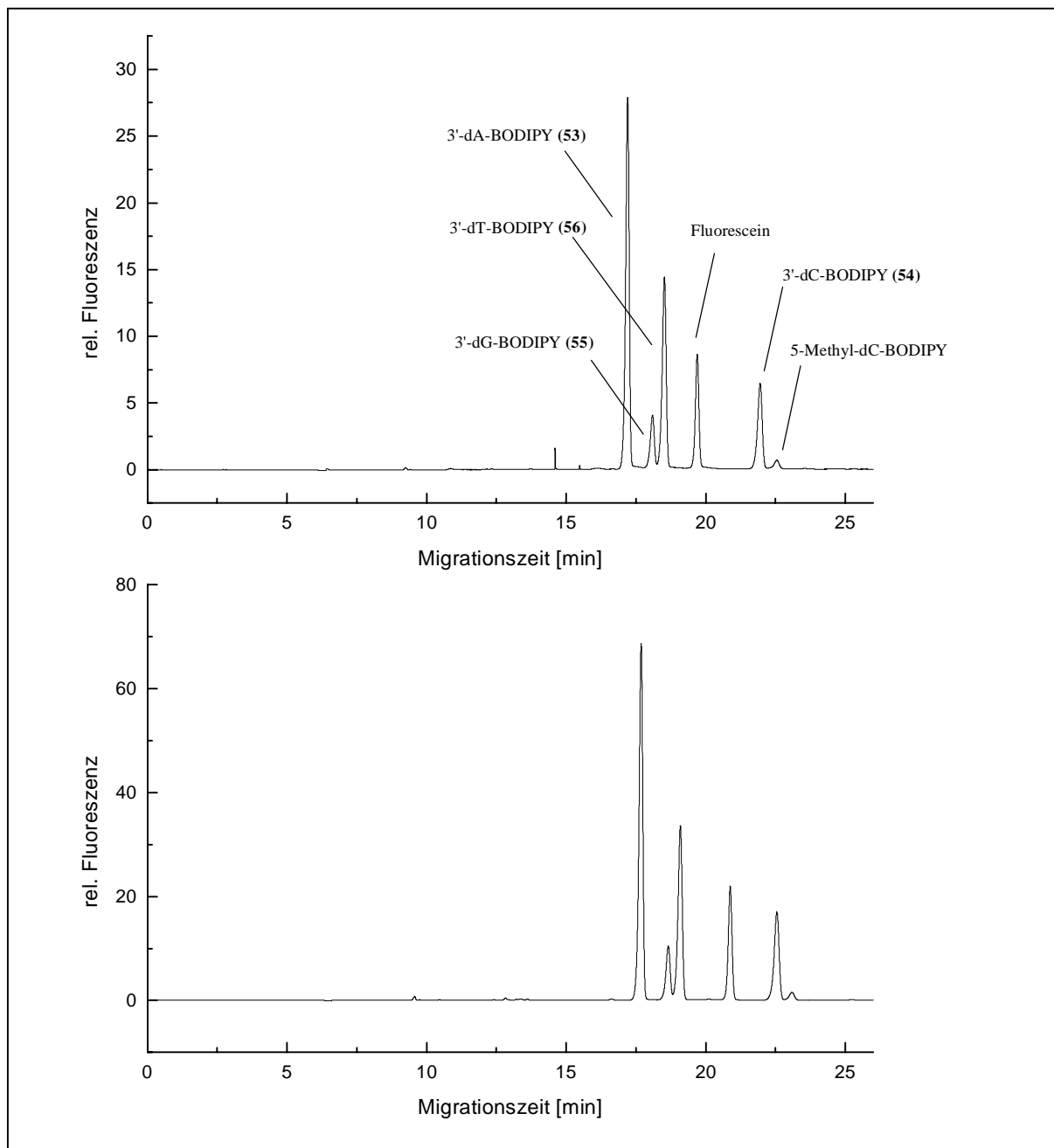


Abb. 90: Analyse zweier CT-DNA-Proben mit Fluorescein als interner Standard

Die Identität der Signale in Abbildung 90 wurde durch Aufstocken mit Standardverbindungen bestimmt. Man erkennt, daß sich Fluorescein als interner Standard nach beendeter Derivatisierung eignet, während eine Zugabe von Carbonsäure-haltigen Referenzsubstanzen bei laufender Markierungsreaktion zu unsinnigen Ergebnissen führt (siehe Abbildung 65). Die quantitative Reproduzierbarkeit der Analyse genomischer DNA wurde anhand der Migrationszeit-normierten Integrale unter Bezugnahme auf das Fluorescein-Signal bestimmt (Tabelle 14).

Konjugat	Integral/MT		auf Fluorescein normiertes Integral	
	<i>Analyse 1</i>	<i>Analyse 2</i>	<i>Analyse 1</i>	<i>Analyse 2</i>
3'-dA-BODIPY	1472453	3729560	3,76	3,73
3'-dG-BODIPY	202264	528430	0,55	0,53
3'-dT-BODIPY	754471	1798401	1,92	1,80
3'-dC-BODIPY	339685	930873	0,87	0,93
5-Methyl-dC-BODIPY	33113	76029	0,08	0,08
Fluorescein	392058	998616	1	1

Tab. 14: Quantitative Auswertung zweier CT-DNA-Analyse; MT = Migrationszeit

Die Daten in Tabelle 13 belegen auf eindrucksvolle Weise die Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode. In beiden Analysen sind die auf den internen Standard normierten Nukleotid-Mengen nahezu identisch. Anhand dieser Untersuchung läßt sich auch die Ungenauigkeit der Probenaufgabe eindeutig belegen. Die Signale in Analyse 1 sind alle um den Faktor  $\sim 3$  größer als in Analyse 2. Dieser Faktor ist - wie man aus dem Fluorescein-Signal erkennen kann – nicht auf eine unterschiedliche Derivatisierungs-Effizienz, sondern ausschließlich auf die Injektionsvarianz zurückzuführen. Somit wird ersichtlich, daß bei der Kapillarelektrophorese zur Bestimmung absoluter Probenmengen aufgrund der Peakflächen die Zugabe eines internen Standards unerlässlich ist.

Ein vergleichbares Signalmuster ergab die Analyse von DNA, die aus humanem Nieren-Gewebe isoliert wurde (Abbildung 91). Der 5-Methyl-dC-Gehalt in dieser DNA beträgt unter der Annahme gleicheffizienter Derivatisierung 3% aller Cytosine, was ebenfalls konsistent mit den Literaturdaten ist.

Anhand dieser Untersuchungen wird deutlich, daß sich das neu entwickelte Verfahren zum Nachweis modifizierter Nukleotide aus genomischer DNA mittels Fluoreszenzmarkierung und kapillarelektrophoretischer Trennung eignet. So konnte die natürlich vorkommende DNA-Modifikation 5-Methyl-Cytidin in realen Proben sicher nachgewiesen und identifiziert werden. Darüber hinaus entspricht die detektierte Menge an diesem modifizierten Nukleotid den in der Literatur veröffentlichten Werten. Ferner erwies sich die Derivatisierungsstrategie als reproduzierbar. Diese Untersuchungen zeigen auch, daß modifizierte Nukleotide, deren Gehalt geringer als der von 5-Methyl-dC ist, nicht mehr in der 1:10000-Verdünnung zu detektieren sind. Für den Nachweis von Addukt-Levels, wie sie normalerweise *in vivo* vorkommen (1 Addukt in  $10^6$ - $10^8$  unmodifizierten Nukleotiden), muß die Probe somit unverdünnt auf die Kapillare gegeben werden.



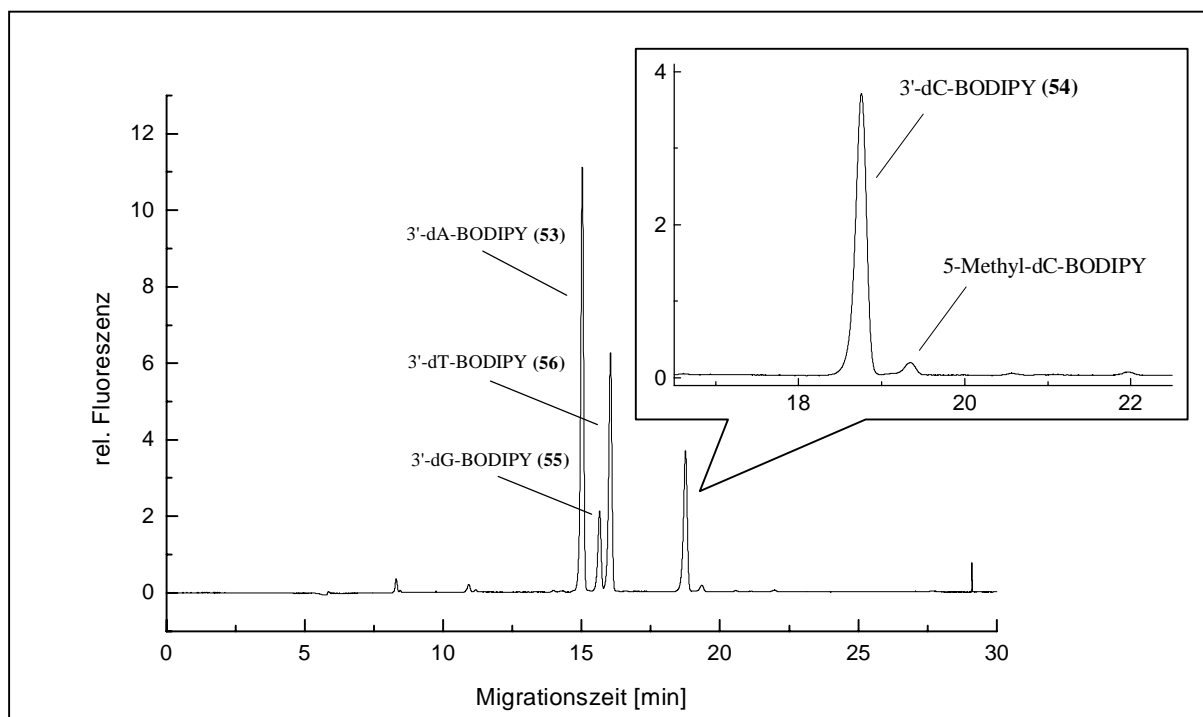


Abb. 91: Elektropherogramm hydrolysierter, fluoreszenzmarkierter DNA aus humanem Nieren-Gewebe

#### 4.4.3 Untersuchungen zur quantitativen Auswertung

Obwohl anhand der Analyse von CT-DNA gezeigt wurde, daß die Fluoreszenzmarkierung reproduzierbar abläuft, ist die direkte Bestimmung der Nukleotid-Mengen aufgrund der Peakflächen nicht möglich. Die Darstellung der fluoreszenzmarkierten Standardverbindungen **53-56** (siehe Abschnitt 4.1.3.2) zeigte bereits, daß die für die verschiedenen Nukleotide erzielten Kopplungsausbeuten unterschiedlich waren (Tabelle 5). Ferner erschwert die basenabhängige Fluoreszenzlöschung des Guanosins eine unmittelbare Quantifizierung der Nukleotide anhand der Signalintensitäten der LIF-Detektion (siehe Abbildung 77). Darüber hinaus zeigt die Analyse des unmodifizierten OLIGO 1 (siehe Abbildung 80), daß durch die DNA-Hydrolyse von einer weiteren, wenn auch reproduzierbaren, Beeinflussung der Fluoreszenzderivatisierung ausgegangen werden muß. Ein weiterer Punkt, der quantitative Aussagen erschwert, ist die Varianz der Injektionsvolumina der hydrodynamischen Probenaufgabe bei der kapillarelektrophoretischen Trennung (siehe Tabelle 14). Alle diese Faktoren verhindern eine direkte Quantifizierung der derivatisierten Nukleotide.

Prinzipiell ähnliche Schwierigkeiten der Quantifizierung bestehen auch für das radioaktive  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahren. So verhindert beispielsweise die Halbwertszeit des verwendeten Isotops von 14 Tagen, die verschiedenen Waschschrte wie auch die nicht exakt zu bestimmende Effizienz des enzymatischen Markierungsschrittes eine absolute Quantifizierung

der detektierten Nukleotide. Aus diesem Grund wird der Anteil an modifizierten Nukleotiden in Form des „relative adduct labeling“-Wertes (RAL-Wert) angegeben. Dazu wird ein Aliquot der zu untersuchenden Probe verdünnt und getrennt markiert und entsprechend der in Abschnitt 4.3.1 verwendeten Methode zur Quantifizierung der unmodifizierten Nukleotide detektiert, während der Großteil der Probe zur Bestimmung der distinkten Addukt-Spots mehrdirektional dünnenschichtchromatographisch getrennt und autoradiographisch entwickelt wird. Der Gehalt an modifizierten Nukleotiden ergibt sich entsprechend 2.14 als:

$$(2.14) \quad RAL = \frac{cpm(Addukte)}{cpm(\sum Nukleotide) \cdot Verdünnungsfaktor}$$

$RAL$  = relative adduct labeling;  $cpm$  = counts per minute

Eine Möglichkeit zur quantitativen Auswertung der Signale der kapillarelektrophoretischen Analyse stellt die Einführung von „Derivatisierungsfaktoren“ dar, die anhand definierter Oligonukleotide bestimmt werden können. Der Vergleich der einzelnen, auf einen internen Standard normierten Peakflächen der derivatisierten Nukleotide mit der durch die Sequenz der Oligonukleotide bekannten eingesetzten Mengen sollte die Ermittlung von Koeffizienten ermöglichen, die die Varianzen der einzelnen Analysenschritte (Hydrolyse-Effizienz, Kopplungsausbeute, injizierte Probenmenge) beinhalten.

Dabei wird entsprechend Tabelle 14 die einzelnen Peakflächen auf das Signal eines geeigneten internen Standards normiert. Die auf diese Weise erhaltenen Koeffizienten entsprechen den Ausgangsmengen der einzelnen Mononukleotide, die aufgrund der Sequenz und der bekannten eingesetzten Menge an Oligonukleotid berechnet werden kann. Aufgrund der nachgewiesenen Reproduzierbarkeit der enzymatischen DNA-Hydrolyse und der Fluoreszenz-Derivatisierung (siehe Abbildung 83 und 90) sollten diese anhand einer bekannten Probe ermittelten Koeffizienten die quantitative Auswertung unbekannter Proben ermöglichen. Von besonderer Bedeutung ist dabei der Einfluß der Reaktionszeit und insbesondere der Probenverdünnung vor der kapillarelektrophoretischen Trennung. Abbildung 82 zeigte die deutliche Abnahme der Signalintensitäten derivatisierter Nukleotide in Abhängigkeit zur Lagerungszeit der verdünnten Probe. Anhand des 5-Methyl-dC-modifizierten OLIGO 3 (Abbildung 92) ist diese Beeinflussung der Signalintensitäten durch die Lagerungszeit ebenfalls nachgewiesen worden (Tabelle 15).

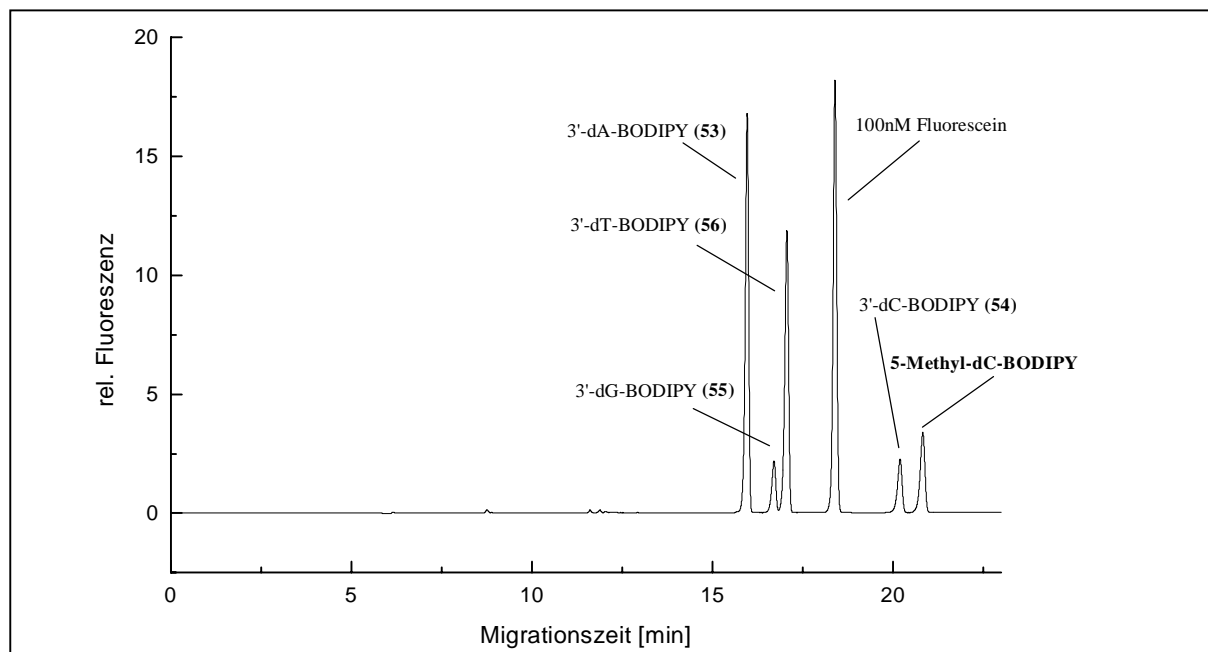


Abb. 92: Elektropherogramm des hydrolysierten, fluoreszenzmarkierten OLIGO 3 mit 100nM Fluorescein als interner Standard

	auf Fluorescein normierte Peakflächen		
	10min nach Verd.	55min nach Verd.	100min nach Verd.
3'-dA-BODIPY	2,57	1,01	0,74
3'-dG-BODIPY	0,18	0,14	0,11
3'-dT-BODIPY	1,73	0,74	0,55
3'-dC-BODIPY	0,22	0,14	0,12
5-Methyl-dC-BODIPY	0,46	0,22	0,16

Tab. 15: Einfluß der Lagerungszeit auf die Signalintensitäten fluoreszenzmarkierter Nukleotide

Anhand der abnehmenden Signalintensitäten bei längerer Lagerung der verdünnten Proben wird ersichtlich, daß für die quantitative Auswertung addukturierter DNA auf die Einhaltung gleichbleibender Bedingungen streng zu achten ist.

Für die quantitative Auswertung von *in vivo* oder *in vitro*-addukturierter DNA ist der Einsatz eines internen Standards problematisch. Am Beispiel der modifizierten Oligonukleotide wird deutlich, daß eine 1:10000-Verdünnung, die integrierbare Signale der unmodifizierten Nukleotide gewährleistet, nur die Detektion von Modifikationen im Promille-Bereich (5-Methylcytidin in CT-DNA, Abbildung 91) ermöglicht. Da DNA-Addukte typischerweise in picomolaren Konzentrationen auftreten, darf die derivatisierte Probe nur leicht oder unverdünnt auf die Kapillare aufgegeben werden. In diesen Fällen kann die Zugabe einer

Farbstoff-Lösung als interner Standard kleinere Signale modifizierter Nukleotide überlagern. So könnte zum Beispiel Fluorescein aufgrund ähnlicher Migrationseigenschaften die Detektion von 8-oxo-dG erschweren (siehe Abbildung 86 und 90). Diese Schwierigkeit könnte dadurch gelöst werden, daß in einer ersten Analyse der Gehalt an 5-Methylcytidin anhand der oben beschriebenen Methode in einer 1:10000-Verdünnung mit Fluorescein als interner Standard ermittelt wird. In einer zweiten Analyse könnte dann die Probe zur Detektion der DNA-Modifikationen unverdünnt injiziert werden. In unverdünnten Proben ist das Signal von 5-Methylcytidin weiterhin integrierbar (siehe Abbildung 94) und könnte als Referenzsignal für die quantitative Auswertung der DNA-Addukte dienen. Somit ist durch dieses schrittweise Vorgehen eine Quantifizierung ohne eine Beeinflußung des Addukt-Musters möglich.

Anahnd spezifisch modifizierter Oligonukleotide können die Derivatisierungsfaktoren einzelner DNA-Addukte ermittelt werden. Wenn anders im Fall von etheno-dA, 5-Methylcytidin und 8-oxo-dG ein gezielter Einbau modifizierter Nukleotide mittels Phosphoramidit-Technik nicht möglich ist, können solche spezifische Modifikationen durch *in vitro*-Inkubation spezieller Oligonukleotide mit ultimalen Karzinogenen hergestellt werden [198-201].

#### **4.4.4 Analyse Aristolochiasäure-modifizierter genomischer DNA**

Die erarbeitete Methode der Fluoreszenzderivatisierung mit anschließender kapillarelektrophoretischer Trennung der markierten Nukleotide sollte abschließend für den Nachweis von DNA-Addukten in genomischer DNA angewendet werden. Aufgrund der weitreichenden Erfahrung der Arbeitsgruppe mit Aristolochiasäure-modifizierter DNA wurde dieses natürliche Kanzerogen für diese Untersuchungen ausgewählt. Die DNA-Proben wurden dankenswerterweise von *Heinz H. Schmeiser*, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, bereitgestellt. Die analysierte modifizierte DNA wurde durch *in vitro*-Inkubation von CT-DNA mit Aristolochiasäure I (AAI, siehe Abschnitt 2.1.3.1) unter Zink-Aktivierung hergestellt [54]. Dabei wurden durch unterschiedliche Mengen an Aristolochiasäure I bei der *in vitro*-Inkubation unterschiedliche Addukt-Level erzeugt. Die RAL-Werte der 3 bereitgestellten Proben wurden mit der <sup>32</sup>P-postlabeling-Methode bestimmt und betrugen 1 Addukt in 10<sup>4</sup> (AA-Level-4), 1 Addukt in 10<sup>5</sup> (AA-Level-5) und 1 Addukt in 10<sup>6</sup> (AA-Level-6) unmodifizierten Nukleotiden. Mit der postlabeling-Methode können bei der *in vitro*-Inkubation von CT-DNA 3 Aristolochiasäure-Addukte nachgewiesen werden (Abbildung 93).

Dabei handelt es sich um dA-AAI, dG-AAI und dA-AAII, welches offenbar durch die Abspaltung der Methoxygruppe gebildet wird [55,202,203].

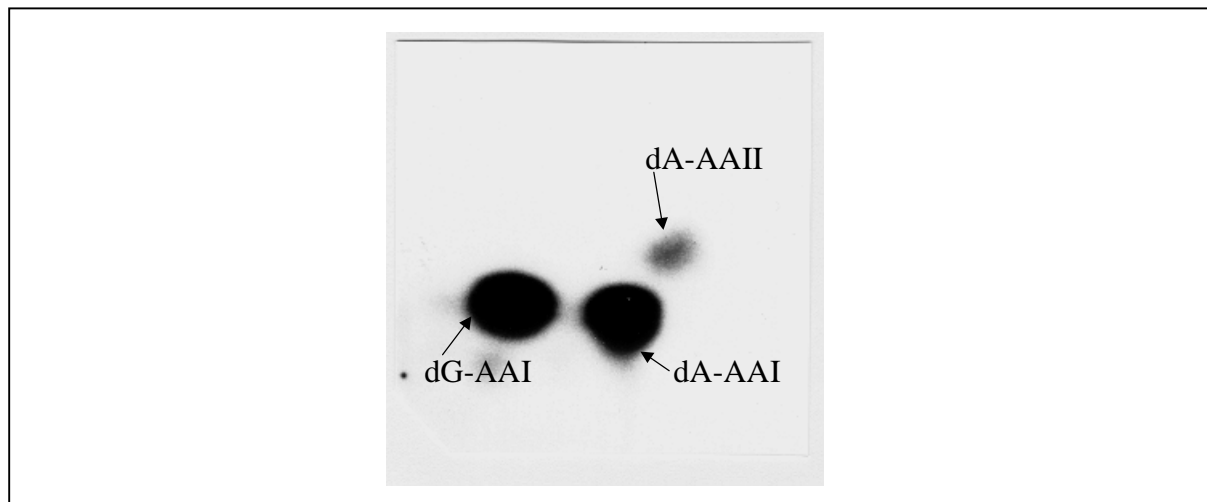


Abb. 93:  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Analyse der *in vitro*-Inkubation von CT-DNA mit AA1

Die unterschiedlichen Adduktlevel sollten eine Identifizierung der Signale der modifizierten Nukleotide aufgrund sich ändernder Signalintensitäten bei der kapillarelektrophoretischen Trennung erleichtern, da bis dato die Synthese entsprechender Standardverbindungen Aristolochiasäure-modifizierter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate nicht gelang. Somit ist die Zuordnung in Frage kommender Fluoreszenzsignale durch Aufstocken der Probe mit einem solchen fluoreszenzmarkierten Standard nicht möglich. Bei der Analyse der Aristolochiasäure-modifizierten DNA wurde unbehandelte CT-DNA als Kontrollprobe eingesetzt. Die kontinuierlich abnehmenden Addukt-Level sollten eine Bestimmung des Detektionslimits der erarbeiteten Methode ermöglichen, da im Vergleich zu der in Abschnitt 4.2.3.1 determinierten Detektionsgrenze für Standardverbindungen von 6pM (dies entspricht einer Detektionsgrenze von 6 Addukten in  $10^7$  unmodifizierten Nukleotiden) bei Analysen genomischer DNA von einer durch die Hydrolyse- und Derivatisierungsmatrix bedingten schlechteren Nachweisgrenze auszugehen ist. Ein wichtiger Unterschied zu den bislang durchgeführten Untersuchungen besteht darin, daß aufgrund der deutlich geringeren Konzentrationen von DNA-Addukten *in vitro* und *in vivo* die Reaktionslösung nicht mehr 1:10000 mit Wasser vor der kapillarelektrophoretischen Trennung verdünnt werden darf, da in diesem Fall lediglich ein Addukt-Level von 1 Addukt in  $10^4$  unmodifizierten Nukleotiden detektiert werden kann, wie der Nachweis von 5-Methylcytidin zeigte. Statt dessen muß für den Nachweis geringerer Addukt-Level die derivatisierte Probe unverdünnt oder nur leicht verdünnt injiziert werden. Entsprechend den in Tabelle 10 aufgeführten Bedingungen wurden

jeweils 10µg DNA hydrolysiert und derivatisiert. Aufgrund der niedrigen Adduktlevel wurde die Probe vor der kapillarelektrophoretischen Trennung 1:10 mit Wasser verdünnt.

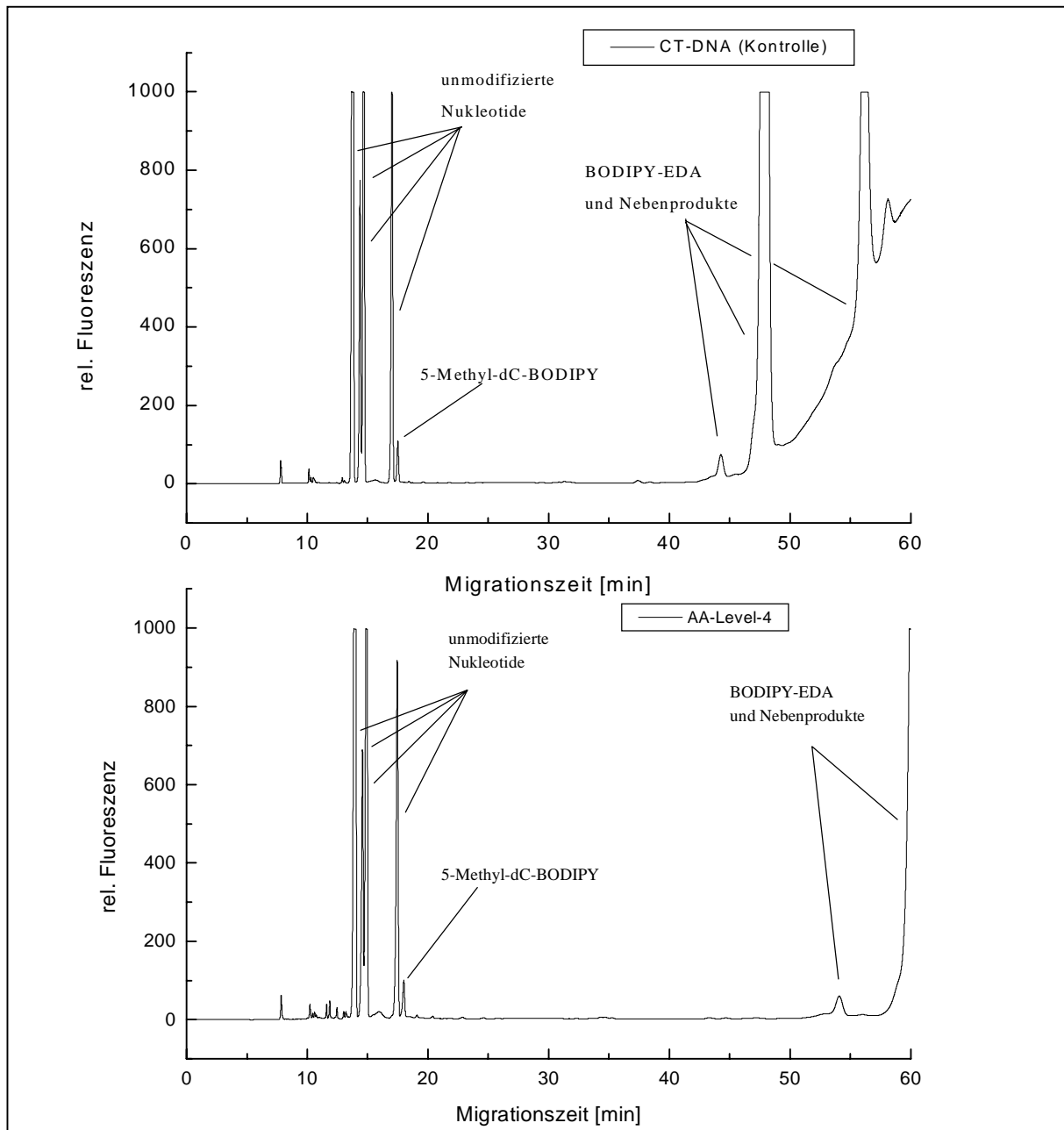


Abb. 94: Gesamtelektropherogramme hydrolysiert und fluoreszenzmarkierter, mit AAI *in vitro*-inkubierter CT-DNA

Das Elektropherogramm der AA-Level-4-DNA zeigt, daß aufgrund der kapillarelektrophoretischen Trennparameter ein micellares Fenster von bis zur 50 Minuten zur Detektion modifizierter Nukleotide zur Verfügung steht, wobei der Bereich bis 20 Minuten durch die Derivatisierungsmatrix nachhaltig beeinflusst ist. Abbildung 95 zeigt diesen Bereich für die untersuchten Proben in geeigneter Vergrößerung.

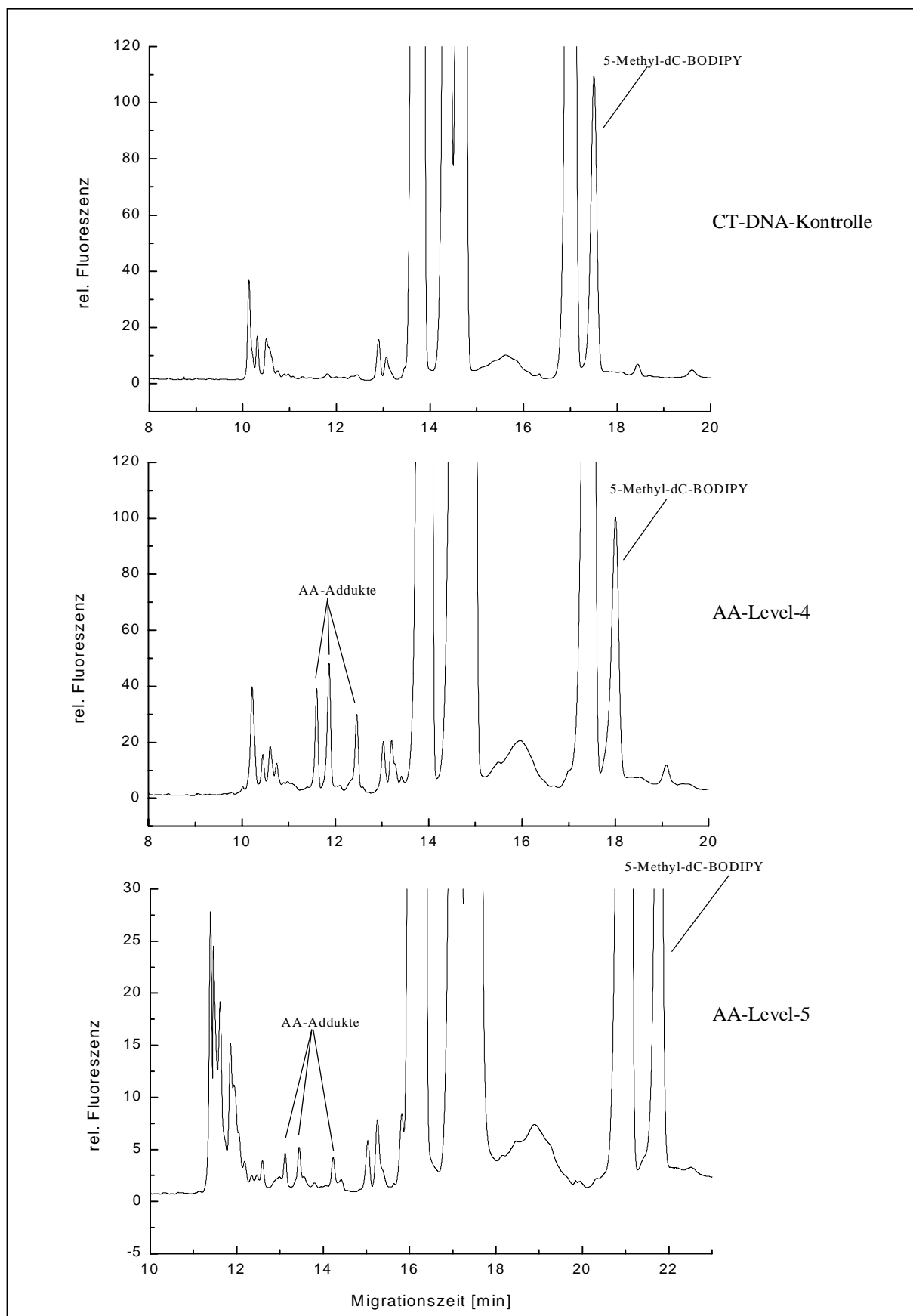


Abb. 95: Elektropherogramme hydrolysierter und fluoreszenzmarkierter, mit AAI *in vitro*-inkubierter CT-DNA unterschiedlicher Addukt-Level

Das Elektropherogramm der unbehandelten CT-DNA verdeutlicht, daß bereits in einer 1:10-Verdünnung mit Wasser deutliche Einflüsse durch die Derivatisierungsmatrix gefunden werden. So wurde bei allen Untersuchungen entsprechender Verdünnungen im Bereich von 10-11 Minuten ein gleichbleibendes, offenbar durch Nebenprodukte des Fluoreszenzmarkers hervorgerufenen Signalmuster detektiert.

Deutlich erkennt man jedoch bei Aristolochiasäure-modifizierter DNA im Bereich von 13-14 Minuten entsprechend der Resultate der  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Analyse eine Gruppe aus drei Signalen, die in der Kontrollprobe nicht auftreten. Darüber hinaus zeigen diese Signale eine klare Konzentrationsabhängigkeit entsprechend dem radioaktiv bestimmten Adduktgehalt der eingesetzten DNA-Proben. Durch den Vergleich mit dem simultan detektierten Signal von 5-Methylcytidin ist eindeutig belegt, daß diese abnehmenden Signalintensitäten nicht auf die Injektionsvarianz bei der Probenaufgabe zurückzuführen sind. Somit können diese Signale aufgrund ihrer Konzentrationsabhängigkeit und der Resultate der  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Analyse den Aristolochiasäure-modifizierten Nukleotiden zugeordnet werden.

Die Analyse der DNA-Probe mit einem Adduktlevel von 1 in  $10^6$  unmodifizierten Nukleotide ergab keine detektierbaren Unterschiede zur Kontroll-DNA. Aufgrund der Matrixeinflüsse bei diesen Analysen ist das reale Detektionslimit von 1 Addukt in  $10^5$  unmodifizierten Nukleotiden etwa um den Faktor 20 höher als die theoretische Nachweisgrenze von 6 Addukten in  $10^7$  unmodifizierten Nukleotiden, wie sie für aufgereinigte Standardverbindungen ermittelt wurde (Abschnitt 4.2.3.1). Als limitierende Faktoren erweisen sich in diesem Fall wie auch schon bei den Standardverbindungen das geringe Probenvolumen wie auch die zu verbessernde Markierungseffizienz.

Das Migrationsverhalten der Aristolochiasäure-Addukte kann wie im Fall von etheno-dA durch den Verlust der exozyklischen Aminofunktion bei der Adduktbildung (siehe Abbildung 10) und der sich somit verringernden Wechselwirkung mit der polaren Micellenoberfläche erklärt werden, die eine schnellere Migration der Addukte im Vergleich mit den unmodifizierten Nukleotiden trotz der vermutlich zunehmenden Lipophilie zur Folge hat.

Anhand der Untersuchung Aristolochiasäure-modifizierter CT-DNA wird ein entscheidender Vorteil der entwickelten Methodik im Vergleich zum  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahren deutlich. So zeigen die Elektropherogramme in Abbildung 95, daß mit den gewählten kapillarelektrophoretischen Trennparametern eine simultane Detektion von 5-Methylcytidin und Aristolochiasäure-Addukten als Repräsentanten völlig unterschiedlicher Adduktklassen erreicht wird. Das  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahren verhindert durch Adduktklassen-spezifische



Trennpuffer bei der mehrdirektionalen Dünnschichtchromatographie einen derartigen simultanen Nachweis.

#### 4.4.5 Diskussion

Die anhand von Standardverbindungen entwickelte Methodik zur Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten aus enzymatischer DNA-Hydrolyse mit anschließender kapillarelektrophoretischer Trennung mittels MEKC wurde zum Nachweis modifizierter Nukleotide aus synthetischen Oligonukleotiden und genomischer DNA angewendet. Dabei gelang der Nachweis von etheno-dA als Repräsentant für ernährungsbedingte Biomarker, 8-oxo-dG als Biomarker für oxidativen Streß und 5-Methylcytidin als natürlich vorkommende DNA-Modifikation aus definierten Oligonukleotiden. Darüber hinaus konnte 5-Methylcytidin in CT-DNA und DNA isoliert aus humanem Gewebe detektiert und in Relation zu unmodifiziertem Cytidin quantifiziert werden. Abschließend gelang der simultane Nachweis von Aristolochiasäure-modifizierten Nukleotiden und 5-Methylcytidin am Beispiel einer *in vitro*-Inkubation von CT-DNA mit Aristolochiasäure I.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde gezeigt, daß das entwickelte Verfahren unverändert auf die Verhältnisse realer enzymatischer DNA-Hydrolysen übertragen werden konnte und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Somit erfüllt die entwickelte Methodik die wichtige Voraussetzung einer unmittelbaren Analytik ohne aufwendige Zwischenaufreinigungs-Schritte.

Die anhand definiert modifizierter Oligonukleotide und CT-DNA untersuchten Migrationseigenschaften fluoreszenzmarkierter DNA-Addukte verdeutlichten, daß die Erhöhung der Selektivität des Elektrolyten bei den MEKC-Trennungen durch die Zugabe von SDS als Micellenbildner offensichtlich auf einer Wechselwirkung der Analyten mit der polaren Micellenoberfläche beruht. Dadurch migrieren sogar deutlich lipophile DNA-Addukte wie Aristolochiasäure-modifizierte Nukleotide aufgrund der Substitution an der polaren exozyklischen Aminofunktion der Purin-Basen schneller als die entsprechenden unmodifizierten Nukleotide. Andererseits wechselwirkt der lipophile Fluoreszenzmarker BODIPY-EDA sehr stark mit der Micelle, was ein ausreichend großes micellares Fenster für den Nachweis der Nukleotide gewährleistet.

Als problematisch hinsichtlich einer universell einsetzbaren DNA-Addukt-Analytik erweist sich das Detektionslimit von 1 Addukt in  $10^5$  unmodifizierten Nukleotiden. Diese Nachweisgrenze ist nicht ausreichend für die Detektion von DNA-Addukten *in vivo*, die

typischerweise in Konzentrationen von 1 Addukt in  $10^6$ - $10^8$  unmodifizierten Nukleotiden vorkommen. Die aufgrund des Detektionslimits von 6pM für fluoreszenzmarkierte Standardverbindungen ermittelte theoretische Nachweisgrenze von 6 Addukten in  $10^7$  unmodifizierten Nukleotiden wird durch die komplexe Matrix einer realen Probe um Faktor 20 erhöht. Da biologisches Material nur begrenzt zur Verfügung steht, ist eine Erhöhung der eingesetzten DNA-Menge zur Sensitivitätssteigerung nicht geeignet. Somit muß zum einen die Effizienz der Fluoreszenzderivatisierung verbessert werden. Zum anderen eröffnen sich Möglichkeiten zur Verbesserung der Nachweisgrenze durch modifizierte Probeninjektionen wie zum Beispiel „electrostacking with reversed field“, die eine Erhöhung der Probenmenge um Faktor 50 ermöglichen sollten (siehe Abschnitt 4.2.3.2).

Zur Quantifizierung der Nukleotidsignale muß aufgrund der schwankenden Injektionsvolumina bei hydrodynamischer Probenaufgabe ein interner Standard der Probe zugeführt werden. Anhand der Untersuchungen an CT-DNA und 5-Methyl-dC-modifizierten Oligonukleotiden konnte gezeigt werden, daß sich Fluorescein aufgrund seiner spektroskopischen Eigenschaften und seinem Migrationsverhalten unter den gewählten kapillarelektrophoretischen Bedingungen eignet. Entgegen den Untersuchungen zur Reaktionskinetik ist die Zugabe Carbonsäure-haltiger Fluoreszenzmarker nach beendeter Derivatisierung unproblematisch (siehe Abbildung 4.1.3.2), da das aktivierende Carbodiimid nach 16h Reaktionszeit vollständig abreagiert ist. Durch die Normierung der Peakflächen auf das Fluorescein-Signal kann unter Berücksichtigung der Sequenz und der Menge an eingesetztem Oligonukleotid für jedes Nukleotid ein korrigierender Derivatisierungsfaktor bestimmt werden, der sämtliche basenspezifische Einflüsse wie Fluoreszenzlöschung, Derivatisierungsausbeute oder hydrolytische Freisetzung aus der eingesetzten DNA berücksichtigt.

Am Beispiel des Nachweises Aristolochiasäure-modifizierter Nukleotide wird ein entscheidender Vorteil der entwickelten Analytik im Vergleich zu dem  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahren deutlich. So konnte gezeigt werden, daß durch den Einsatz der Kapillarelektrophorese als Trennmethode der simultane Nachweis sogenannter „bulky-adducts“ (sperrige Modifikationen durch zum Beispiel PAHs oder Aristolochiasäure) und geringfügig modifizierter Nukleotide (5-Methylcytidin) gelingt. Darüber hinaus belegen die Untersuchungen an etheno-dA und 8-oxo-dG-modifizierten Oligonukleotiden, daß diese Modifikationen aufgrund ihres unterschiedlichen Migrationsverhaltens ebenfalls simultan getrennt werden können. Dieser simultane Nachweis von DNA-Modifikationen hervorgerufen durch unterschiedliche Substanzklassen ist bislang in der Literatur noch nicht beschrieben

worden. So müssen beispielsweise beim  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Verfahren die Laufmittel der mehrdirektionalen Dünnschichtchromatographie der Natur der Modifikationen angepasst werden, was eine vergleichbare Anwendungsbreite dieser Methode grundsätzlich ausschließt. Somit eignet sich die Verbindung von Fluoreszenzmarkierung enzymatischer DNA-Hydrolysate mit anschließender kapillarelektrophoretischer Trennung für die Untersuchung unterschiedlichster DNA-Addukte in einem einzigen Analysenlauf. Gerade im Hinblick auf epidemiologische Studien mit großer Probenzahl könnte die Methode aufgrund ihrer Automatisierbarkeit das wichtige Kriterium des hohen Probendurchsatzes erfüllen. Allerdings muß zu diesem Zweck die Nachweisgrenze in realen Proben noch verbessert werden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zum Nachweis von modifizierten Nukleotiden (DNA-Addukten) mittels Fluoreszenzmarkierung und anschließender kapillarelektrophoretischer Trennung mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion entwickelt. Zu diesem Zweck mußte eine Derivatisierungsstrategie gefunden werden, die eine reproduzierbare und möglichst effiziente Kopplung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten, erhalten durch enzymatische DNA-Hydrolyse, mit geeigneten Fluoreszenzmarkern ermöglicht. Es wurde gezeigt, daß die Markierung an der 5'-OH-Position der Nukleotide mit Fluoreszenzmarkern, die eine Phosphoramidit-Ankergruppe tragen, aufgrund von Mehrfachmarkierungen durch die zusätzliche Derivatisierung exozyklischer Aminogruppen der Nukleobasen nicht selektiv durchgeführt werden kann. Demgegenüber eröffnet die Kopplung eines Fluoreszenzmarkers, der eine primäre aliphatische Aminogruppe als Ankergruppe trägt, die selektive Derivatisierung der Phosphatgruppe von 2'-Desoxynukleosid-3'- oder 5'-phosphaten mittels Carbodiimid-Aktivierung. Anhand eines Modells, der Umsetzung von 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphat mit Glycinethylester, wurden Reaktionsparameter für die Fluoreszenzderivatisierung enzymatischer DNA-Hydrolysate entwickelt, die eine einfache und effiziente Umsetzung unter milden Bedingungen mit einem vertretbaren finanziellen Aufwand ermöglichen sollten. Als unabdingbare Voraussetzung für die selektive Markierung der Phosphatgruppe stellte sich heraus, daß der eingesetzte Fluoreszenzmarker wie die zur Aufrechterhaltung des geeigneten pH-Wertes einzusetzende Puffersubstanz frei von Carbodiimid-aktivierbaren funktionellen Gruppe wie Carbonsäuren oder Phosphatgruppen sein muß. Die mit diesem Modell gefundenen Reaktionsbedingungen konnten zur Fluoreszenzmarkierung von Nukleotiden in wäßrigem Medium angewendet werden. Ferner wurde gezeigt, daß die entwickelte Methodik auch in der komplexen Matrix der enzymatischen DNA-Hydrolyse zuverlässig verläuft. Die standardisierten DNA-Hydrolyse-Bedingungen der für den Nachweis von DNA-Addukten etablierten  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Methode, mußten aufgrund der oben genannten Anforderungen an die Puffersubstanz angepaßt werden, um die Fluoreszenzmarkierung direkt ohne Zwischenreinigung im Hydrolysat durchführen zu können.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Entwicklung kapillarelektrophoretischer Parameter zur Trennung fluoreszenzmarkierter Nukleotide. Dabei erwies sich die Trennung mittels micellarer elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) in unbeschichteten fused-silica-Kapillaren als geeignet. Durch die Verwendung von SDS als Micellenbildner wurde

eine Basislinien-Trennung der derivatisierten Nukleotide erreicht, wobei aufgrund der starken lipophilen Wechselwirkung des Fluoreszenzmarkers ein hinreichend großes micellares Fenster gewährleistet und eine Überlagerung der Nukleotid-Signale durch den Marker-Überschuß vermieden werden konnte. Dadurch konnte die Derivatisierungslösung direkt ohne weitere Aufreinigung kapillarelektrophoretisch untersucht werden.

Die entwickelte Methodik wurde zum Nachweis modifizierter Nukleotide angewendet. So gelang der Nachweis von etheno-dA, ein Biomarker ernährungsbedingter Modifikationen, 8-oxo-dG als Biomarker für oxidativen Streß und 5-Methylcytidin als natürlich vorkommende DNA-Modifikation aus definiert modifizierten, synthetischen Oligonukleotiden. Anhand von Kalbsthymus-DNA und DNA isoliert aus humanem Gewebe wurde gezeigt, daß das Verfahren sehr gut geeignet ist, 5-Methylcytidin, das eine bedeutende Rolle in der Zelldifferenzierung und Genexpressionskontrolle besitzt, direkt nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Analyse von mit Aristolochiasäure I *in vitro*-modifizierter DNA ergab ein Detektionslimit für DNA-Addukte von 1 Addukt in  $10^5$  unmodifizierten Nukleotiden. Diese zu geringe Nachweisgrenze schließt momentan einen universellen Einsatz dieser Methodik aus. Allerdings kann durch verbesserte Derivatisierungsbedingungen und Injektionsmethoden bei der Kapillarelektrophorese diese Nachweisgrenze deutlich verbessert werden.

Ein entscheidender Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß DNA-Addukte, hervorgerufen durch unterschiedliche Klassen von Kanzerogenen, im Gegensatz zur  $^{32}\text{P}$ -postlabeling-Methode, simultan nachgewiesen werden können. Verbunden mit der Automatisierbarkeit der entwickelten Derivatisierungstechnik und der kapillarelektrophoretischen Trennung ermöglicht das erarbeitete Konzept einen hohen Probendurchsatz. Somit könnten DNA-Addukte als Biomarker genotoxischer Substanzen in großangelegte molekular-epidemiologische Studien einbezogen werden, was entscheidend zum besseren Verständnis der Krebsentstehung und vor allem der lebensgewohnheitsbedingten Krebs-Risikofaktoren beitragen würde. Ferner ist die Abschätzung des individuellen Krebsrisikos in Abhängigkeit zu den Lebensgewohnheiten im Sinne eines „Frühwarnsystems“ basierend auf der erarbeiteten Methodik denkbar.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Geräte und Materialien

Kernresonanzspektren:

- $^1\text{H}$ -NMR: 250MHz Bruker AC-250;  
300MHz Bruker AM-300;  
500MHz Bruker AM-500;  
int. Standard: Tetramethylsilan,  $\delta = 0,00\text{ppm}$ ;
- $^{13}\text{C}$ -NMR: 500MHz Bruker AM-500  
int. Standard: Tetramethylsilan,  $\delta = 0,00\text{ppm}$
- $^{11}\text{B}$ -NMR: 300MHz Bruker AM-300;  
int. Standard 1: flüssiges,  $\delta = 0,00\text{ppm}$ ;  
int. Standard 2:  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ -Lösung in  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ,  $\delta_{\text{TMS}} = 100,0\text{ppm}$
- $^{19}\text{F}$ -NMR: 250MHz Bruker AC-250;  
int. Standard: Trifluoracetat in Wasser,  $\delta = 0,00\text{ppm}$

Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS):

*Finnigan MAT TSQ 7000*;

Chromatographie:

DC-Folien: Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck (Darmstadt);

Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (0,063-0,2mm), Machey&Nagel (Düren);

UV-aktive Substanzen wurden bei 254nm (in seltenen Fällen bei 366nm) detektiert;

Dimethoxytrityl-Derivate wurden durch Besprühen mit Schwefelsäure, Zucker-Derivate durch zusätzliches Erhitzen auf 160°C sichtbar gemacht;

Präparative HPLC:

Jasco PU-980 Intelligent HPLC-Pump; Jasco (Groß-Umstadt)

Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit; Jasco (Groß-Umstadt)

Jasco DG-980-50 3-Line Degaser; Jasco (Groß-Umstadt)

Säule: ODS Hypersil RP18, 5 $\mu\text{m}$ , 250x20mm, Bischoff (Leonberg);

UV-Detektion: Latek SPD-2A Spectrophotometric Detector mit präparativer Meßzelle;

FL-Detektion: Jasco FP-920 Intelligent Fluorescence Detector mit präparativer Meßzelle;

Laufmittel der Firmen Merck (Lichrosolv<sup>®</sup>) und Roth (Gradient Grade); Entgasung durch 5min Beschallen mit Ultraschall;

1M TEAA-Stammlösung: zu 1mol Eisessig (57,2ml) in 500ml Wasser werden 1mol Triethylamin (139,4ml) unter Eiskühlung und Rühren langsam zugegeben. Man füllt auf 900ml mit Wasser auf und stellt pH=7,0 ein. Anschließend wird auf 1l mit Wasser aufgefüllt.

<sup>32</sup>P-postlabeling-Analysen:

Filterpapier Whatman 3 MM CHR;

PEI-Cellulose DC-Fertigfolien, Macherey&Nagel (Düren);

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP, spezifische Aktivität <7000Ci/mmol, ICN (Braunschweig);

Mikrokokken-Endonuklease aus *Staphylococcus aureus*, Sigma (Deisenhofen);

Phosphodiesterase aus Kalbsmilz, Boehringer (Mannheim);

Quantifizierung radioaktiver Spots mittels Instand-Imager-System von Canberra Packard;

Kapillarelektrophorese:

BioFocus 3000TC Kapillarelektrophorese-System mit LIF<sup>2</sup>-Detektor (Ar-Ionen-Laser der Wellenlänge 488nm, Emissionsfilter 520 DF 30), BioRad (München);

unbeschichtete fused-silica-Kapillare, Durchmesser = 50 $\mu$ m, CS-Chromatographie-Servive (Langerwehe);

UV-Absorptionsmessungen:

UV/visible Spectrometer Lambda 18, Perkin-Elmer (Foster City) bzw.

UV/Vis Diode Array Spectrophotometer lightwave, WPA (Cambridge)

Fluoreszenzmessungen:

LS100 Spectrometer, PTI (Kanada)

Reagenzien:

Fluoreszenzmarker: [4,7,2',4',5',7'-hexachloro-(3',6'-dipivaloylfluoresceinyl)-6-carboxamidoethyl]-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit, Glen Research (Sterling, USA);

4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl-ethylendiamin (BODIPY-EDA), Molecular Probes (Eugene, USA);

unmodifizierte Nukleosid-phosphoramidite wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen;

modifizierte Nukleosid-phosphoramidite (8-Oxo-7,8-dihydro-5'-dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-isobutyryl-2'-deoxyguanosin-3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit, 5'-Dimethoxytrityl-N-benzoyl-5-methyl-2'-deoxycytidin-3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-

diisopropyl)]-phosphoramidit und 5'-Dimethoxytrityl-etheno-2'-deoxyadenosine-3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit) wurden von Glen Research (Sterling, USA) bezogen;

Kalbsthymus-DNA wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen;

alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von Wolfgang Weinig, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, aus den oben aufgeführten Nukleosid-Phosphoramiditen hergestellt;

alle im Zusammenhang mit organisch-präparativen Arbeiten verwendeten Chemikalien waren p.A.-Qualität;

in allen Reaktionen wurden wasserfreie Lösungsmittel verwendet;

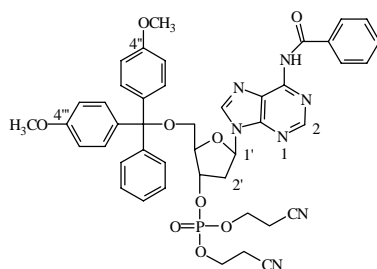
## 6.2 Synthesevorschriften

### *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung vollständig geschützter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate (5-8):*

500mg 5'-O-(4'',4'''-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxynukleosid-3'-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit **1-4** (~0,6mmol) werden jeweils in 6ml wasserfreiem Acetonitril in einem ausgeheizten Kolben gelöst. Man gibt im Argon-Gegenstrom 100mg Hydroxypropionitril (1,4mmol) und 4ml einer 0,45M 1H-Tetrazol-Lösung in Acetonitril (1,8mmol) dazu und rührt bei Raumtemperatur. Zeigt die Reaktionskontrolle mittels DC (Chloroform/Methanol = 9/1) kein Edukt mehr, gibt man 3,4ml einer 3%igen Cumolhydroperoxid-Lösung in Acetonitril dazu. Nach beendeter Oxidation (Reaktionskontrolle mittels DC in Chloroform/Methanol = 9/1) gibt man einige Tropfen Isopropanol zum Abfangen des Oxidationsmittel-Überschußes hinzu, engt ein und nimmt den Rückstand in Chloroform auf. Man wäscht 3mal mit 5ml 2%iger wäßriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und trocknet die organische Phase über wasserfreies Natriumsulfat. Das Chloroform wird abrotiert und der ölige Rückstand mit Chloroform/Methanol = 9/1 an Kieselgel chromatographiert.



**5'-O-(4'',4'''-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenosin-N<sup>4</sup>-benzoyl-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 5:**



Ausbeute: 275mg (0,33mol) = 60%

R<sub>f</sub> (Chloroform/Methanol = 9/1): 0,45

(+)ESI-MS (C<sub>44</sub>H<sub>42</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>P; 843,83g/mol): m/z=844,3 [M+H]<sup>+</sup> (100%); m/z=866,3 [M+Na]<sup>+</sup> (10%)

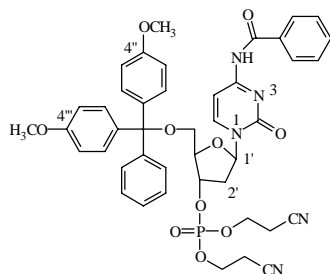
(+)ESI-DAU (844,3): m/z=303,1 [DmTr]<sup>+</sup> (100%); m/z=240,1 [gesch. Base]<sup>+</sup> (80%)

(-)ESI-MS: m/z=842,3 [M-H]<sup>-</sup> (80%); m/z=878,5 [M+Cl]<sup>-</sup> (60%); m/z=789,1 [M-Cyanoethyl]<sup>-</sup> (100%)

(-)ESI-DAU (842,3): m/z=789,0 [M-Cyanoethyl]<sup>-</sup> (90%); m/z= 735 [M-2Cyanoethyl]<sup>-</sup> (100%); m/z=237,9 [gesch.Base]<sup>-</sup> (100%)

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=9,15 (s, 1 N<sup>4</sup>H); δ=8,67 (s, 1 H<sub>8</sub>); δ=8,14 (s, 1 H<sub>2</sub>); δ=6,51-8,03 (m; 18 arom. H); δ=6,50 (dd, 1 H<sub>1'</sub>); δ=5,30 (dddd, 1 H<sub>3'</sub>); δ=4,23-4,44 (m, 4 O-CH<sub>2</sub>- und 1 H<sub>4'</sub>); δ=3,77 (s, 6 -OCH<sub>3</sub>); δ=3,44-3,48 (m, 2 H<sub>5'</sub>); δ=3,10-3,30 (dddd, 1 H<sub>2'</sub>); δ=2,67-2,77 (m, 4 CH<sub>2</sub>-CN und 1 H<sub>2'</sub>);

**5'-O-(4'',4'''-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin-N<sup>4</sup>-benzoyl-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 6:**



Ausbeute: 332mg (0,41mmol) = 68% der Theorie

R<sub>f</sub> (Chloroform/Methanol = 9/1) = 0,36

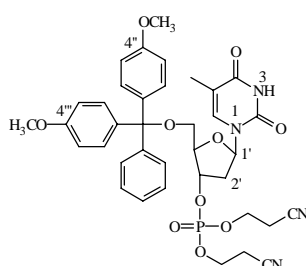
(+)ESI-MS (C<sub>43</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P; 819,80g/mol): m/z=820,4 [M+H]<sup>+</sup> (100%); m/z=842,3, [M+Na]<sup>+</sup> (40%)

(+)ESI-DAU (820,4): m/z=303,1 [DmTr]<sup>+</sup> (100%); m/z=216,0 [gesch. Base]<sup>+</sup> (60%)

(-)ESI-MS:  $m/z=818,2$   $[M-H]^-$  (100%);  $m/z=854,3$   $[M+Cl]^-$  (50%);  $m/z=765,5$   $[M-Cyanoethyl]^-$  (60%)

$^1H$ -NMR (250MHz;  $CDCl_3$ ):  $\delta=7,88$  und  $7,90$  (d, 1 **H5** und 1 **H6**);  $\delta=6,85-7,60$  (m, 18 arom. **H**);  $\delta=6,30$  (dd, 1 **H1'**);  $\delta=5,13$  (dddd, 1 **H3'**);  $\delta=4,15-4,33$  (m, 4 O-**CH**<sub>2</sub>- und 1 **H4'**);  $\delta=3,79$  (s, 6 -O**CH**<sub>3</sub>);  $\delta=3,44-3,52$  (m, 2 **H5'**);  $\delta=3,91-4,01$  (dddd, 2 **H2'**);  $\delta=2,70-2,80$  (m, 4 **CH**<sub>2</sub>-CN);  $\delta=2,31-2,40$  (ddd, 1 **H2'**)

**5'-O-(4'',4'''-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxythymidin-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 7:**



Ausbeute: 319mg (0,44mmol) = 79% der Theorie

$R_f$  (Chloroform/Methanol = 9/1) = 0,53

(+)ESI-MS ( $C_{37}H_{39}N_4O_{10}P$ ; 730,71g/mol):  $m/z=748,3$   $[M+NH_4]^+$  (50%);  $m/z=753,2$   $[M+Na]^+$  (100%)

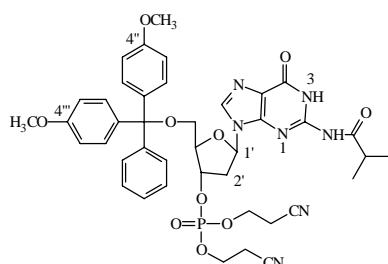
(+)ESI-DAU (753,2):  $m/z=303,0$   $[DmTr]^+$  (100%);  $m/z=549,2$   $[M-Phosphatgruppe]^+$  (80%)

(-)ESI-MS:  $m/z=729,1$   $[M-H]^-$  (100%);  $m/z=676,2$   $[M-Cyanoethyl]^-$  (40%);

(-)ESI-DAU (729,1):  $m/z=203,0$   $[Base]^-$  (100%)

$^1H$ -NMR (250MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta=7,53$  (d, 1 **H6**);  $\delta=7,46-6,80$  (m, 13 arom. **H**);  $\delta=6,45-6,39$  (dd, 1 **H1'**);  $\delta=5,19-5,14$  (dddd, 1 **H3'**);  $\delta=4,15-4,32$  (m, 4 O-**CH**<sub>2</sub>- und 1 **H4'**);  $\delta=3,79$  (s, 6 -O**CH**<sub>3</sub>);  $\delta=3,38-3,57$  (m, 2 **H5'**);  $\delta=2,60-2,78$  (m, 4 **CH**<sub>2</sub>-CN und 1 **H2'**);  $\delta=2,39-2,50$  (dddd, 1 **H2'**);  $\delta=1,44$  (d, 3 -**CH**<sub>3</sub>)

**5'-O-(4'',4'''-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyguanosin- $N^2$ -isobutyryl-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 8:**



Ausbeute: 292mg (0,35mmol) = 65% der Theorie

$R_f$  (Chloroform/Methanol = 9/1) = 0,51

(+)ESI-MS ( $C_{41}H_{44}N_7O_{10}P$ , 825,81g/mol):  $m/z=826,4$   $[M+H]^+$  (100%);  $m/z=848,5$   $[M+Na]^+$  (20%)

(+)ESI-DAU (826,4):  $m/z=303,1$   $[DmTr]^+$  (100%);  $m/z=222,1$  [gesch. Base] $^+$  (30%)

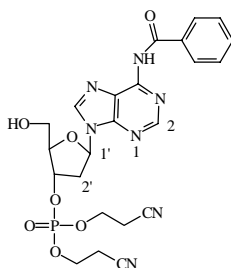
(-)ESI-MS:  $m/z=824,3$   $[M-H]^-$  (20%);  $m/z=860,2$   $[M+Cl]^-$  (100%)

$^1H$ -NMR (250MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta=8,92$  (s, 1 **H**8);  $\delta=7,46-6,73$  (m, 13 arom. **H**);  $\delta=6,13-6,22$  (dd, 1 **H**1');  $\delta=5,41-5,37$  (dddd, 1 **H**3');  $\delta=4,35-4,14$  (m, 4 O-**CH**<sub>2</sub>- und 1 **H**4');  $\delta=3,74$  (s, 6 -O**CH**<sub>3</sub>);  $\delta=3,37$  (m, 2 **H**5');  $\delta=3,02-3,08$  (m, 1 **H**2');  $\delta=2,89-2,81$  (m, 4 **CH**<sub>2</sub>-CN und 1 **H**2');  $\delta=2,28-2,39$  (tt, 1 **CH**-(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,06-1,15 (dt, 6 **CH**<sub>3</sub>)

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Dedimethoxytrytylierung vollständig geschützter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate (9-12):**

100mg der vollständig geschützten 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate **5-8** (~0,12mmol) werden jeweils in 10ml Nitromethan gelöst. Man gibt 10ml mit Zinkbromid gesättigtem Nitromethan dazu und rührt bei Raumtemperatur. Zeigt die Reaktionskontrolle mittels DC (Chloroform/Methanol = 9/1) kein Edukt mehr, werden 25ml wässriger 1M Ammoniumacetat-Lösung zugegeben. Man extrahiert 3mal mit 4ml Dichlormethan und trocknet die organischen Phasen über wasserfreies Natriumsulfat. Das Dichlormethan wird abrotiert und der ölige Rückstand mit Chloroform/Methanol = 9/1 an Kieselgel chromatographiert.

**2'-Desoxyadenosin-*N*<sup>4</sup>-benzoyl-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat **9**:**



Ausbeute: 30mg (54 $\mu$ mol) = 45% der Theorie

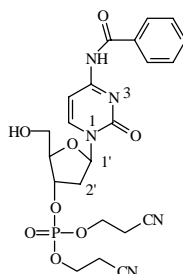
$R_f$  (Chloroform/Methanol = 9/1) = 0,20

(+)ESI-MS ( $C_{23}H_{24}N_7O_7P$ ; 541,46g/mol):  $m/z=541,9$   $[M+H]^+$  (100%);  $m/z=563,6$   $[M+Na]^+$  (10%)

$^1H$ -NMR (250 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta=9,42$  (s, 1 **N**<sup>4</sup>**H**);  $\delta=8,70$  (s, 1 **H**8);  $\delta=8,19$  (s, 1 **H**2);  $\delta=8,19-7,98$  (m, 2 benzoyl. **H**);  $\delta=7,57-7,45$  (m, 3 benzoyl. **H**);  $\delta=6,48-6,42$  (dd, 1 **H**1');  $\delta=5,38-5,34$

(dddd, 1 **H3'**);  $\delta=4,45$  (m, 1 **H4'**);  $\delta=4,31-4,31$  (m, 4 O-**CH**<sub>2</sub>-);  $\delta=3,99-3,88$  (m, 2 **H5'**);  $\delta=3,22-3,09$  (m, 1 **H2'**);  $\delta=2,85-2,80$  (m, 4 **CH**<sub>2</sub>-CN);  $\delta=2,75-2,73$  (ddd, 1 **H2'**);

**2'-Desoxycytidin-N<sup>4</sup>-benzoyl-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 10:**



Ausbeute: 20mg (38 $\mu$ mol) = 21% der Theorie

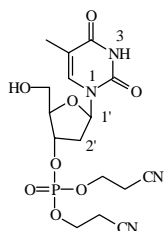
R<sub>f</sub> (Chloroform/Methanol = 9/1) = 0,28

(+)ESI-MS (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>P; 517,43g/mol): m/z=518,0 [M+H]<sup>+</sup> (60%); m/z=539,9 [M+Na]<sup>+</sup> (100%)

(-)ESI-MS): m/z=516,1 [M-H]<sup>-</sup> (100%); m/z=551,9 [M+Cl]<sup>-</sup> (100%)

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta=8,32$  (d, 1 **H6**);  $\delta=7,86$  (m, 2 benzoyl. **H**);  $\delta=7,60-7,43$  (m, 3 benzoyl. **H** und 1 **H5**);  $\delta=6,25$  (dd, 1 **H1'**);  $\delta=5,27$  (dddd, 1 **H3'**);  $\delta=4,37-4,28$  (m, 4 O-**CH**<sub>2</sub>- und 1 **H4'**);  $\delta=3,93$  (m, 2 **H5'**);  $\delta=2,75-2,87$  (m, 4 -**CH**<sub>2</sub>-CN und 1 **H2'**);  $\delta=2,41-2,51$  (m, 1 **H2'**)

**2'-Desoxythymidin-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 11:**



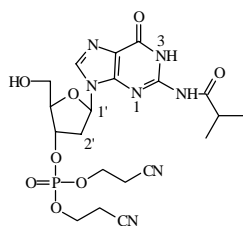
Ausbeute: 29mg (68 $\mu$ mol) = 49% der Theorie

R<sub>f</sub> (Chloroform/Methanol = 9/1) = 0,07

(+)ESI-MS (C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>P; 428,33g/mol): m/z=451,0 [M+Na]<sup>+</sup> (100%); m/z=879,2 [2M+Na]<sup>+</sup> (40%)

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta=7,42$  (d, 1 **H6**);  $\delta=6,21$  (dd, 1 **H1'**);  $\delta=5,22$  (m, 1 **H3'**);  $\delta=4,26-4,38$  (m, 4 O-**CH**<sub>2</sub>- und 1 **H4'**);  $\delta=3,93$  (m, 2 **H5'**);  $\delta=2,53-2,85$  (m, 4 -**CH**<sub>2</sub>-CN und 2 **H2'**);  $\delta=1,92$  (s, 3 **CH**<sub>3</sub>)

**2'-Desoxyguanosin-N<sup>2</sup>-isobutyryl-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 12:**



Ausbeute: 41mg (80μmol) = 67% der Theorie

R<sub>f</sub> (Chloroform/Methanol = 9/1) = 0,17

(+)ESI-MS (C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>P; 523,44g/mol): m/z=524,0 [M+H]<sup>+</sup> (100%); m/z=546,0 [M+Na]<sup>+</sup> (50%)

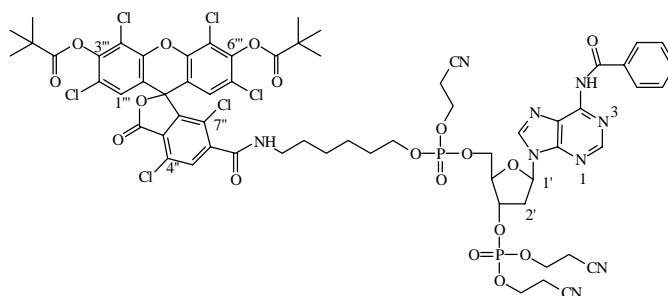
(-)ESI-MS: m/z=522,0 [M-H]<sup>-</sup> (20%); m/z=557,9 [M+Cl]<sup>-</sup> (100%)

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=12,11 (s, 1 NH); δ=9,15 (s, 1 NH); δ=7,80 (s, 1 H<sub>8</sub>); δ=6,21 (dd, 1 H<sub>1'</sub>); δ=5,41 (dddd, 1 H<sub>3'</sub>); δ=4,32-4,40 (m, 4 O-CH<sub>2</sub> und 1 H<sub>4'</sub>); δ=3,87-3,93 (m, 2 H<sub>5'</sub>); δ=2,99-3,08 (m, 1 H<sub>2'</sub>); δ=2,85 (m, 4 -CH<sub>2</sub>-CN); δ=2,77-2,66 (m, 1 H<sub>2'</sub> und 1 CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); δ=0,83-0,90 (dt, 6 CH<sub>3</sub>)

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Fluoreszenzmarkierung von selektiv 5'-OH-entschützten Nukleotiden mittels Phosphoramidit-Technik (14-17):**

15mg Dedimethoxytritylierter geschützter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate **9-12** (~30μmol) werden jeweils in 3ml wasserfreiem Acetonitril in einem ausgeheizten Kolben gelöst. Man gibt im Argon-Gegenstrom 55mg [4,7,2',4',5',7'-hexachloro-(3',6'-dipivaloylfluoresceinyl)-6-carboxamidoethyl]-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit (53μmol) in 4ml wasserfreiem Acetonitril und 400μl einer 1M 4,5-Dicyanoimidazol-Lösung in wasserfreiem Acetonitril (400μmol) dazu und rührt bei Raumtemperatur. Zeigt die Reaktionskontrolle mittels DC (Chloroform/Methanol = 85/15) kein Edukt mehr, gibt man 600μl einer 3%igen Cumolhydroperoxid-Lösung in Acetonitril dazu. Nach beendeter Oxidation (Reaktionskontrolle mittels DC in Chloroform/Methanol = 85/15) gibt man einige Tropfen Isopropanol zum Abfangen des Oxidationsmittel-Überschusses hinzu, engt ein und nimmt den Rückstand in Chloroform auf. Man wäscht 3mal mit 5ml 2%iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und trocknet die organische Phase über wasserfreies Natriumsulfat. Das Chloroform wird abrotiert und der ölige Rückstand mit Chloroform/Methanol = 95/5 an Kieselgel chromatographiert.

**5'-O-[[4'',7'',2''',4''',5''',7'''-hexachloro-(3''',6'''-dipivaloylfluoresceinyl)-6''-carbox-amidohexyl]-O-(2-cyanoethyl)phosphatidyl]-2'-desoxyadenosin-N<sup>4</sup>-benzoyl-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 14:**



Ausbeute: 15mg (10μmol) = 35% der Theorie

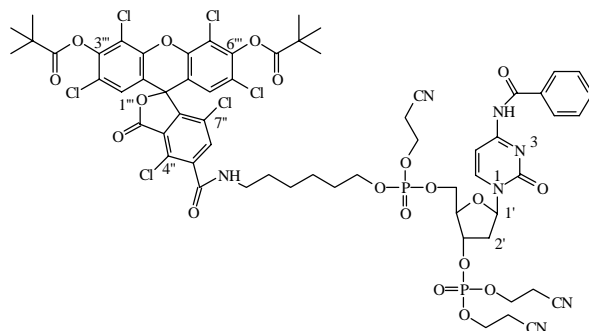
R<sub>f</sub> (Chloroform/Methanol = 85/15) = 0,52

(+)ESI-MS (C<sub>63</sub>H<sub>61</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>9</sub>O<sub>18</sub>P<sub>2</sub>; 1505,17g/mol): m/z=1506,1 [M+H]<sup>+</sup> (100%); m/z=1528,2 [M+Na]<sup>+</sup> (30%)

(+)ESI-DAU (1506,1): m/z=240,0 [gesch. Base]<sup>+</sup> (100%)

(-)ESI-MS: m/z=1450,8 [M-Cyanoethyl]<sup>-</sup> (100%)

**5'-O-[[4'',7'',2''',4''',5''',7'''-hexachloro-(3''',6'''-dipivaloylfluoresceinyl)-6''-carbox-amidohexyl]-O-(2-cyanoethyl)phosphatidyl]-2'-desoxycytidin-N<sup>4</sup>-benzoyl-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 15:**



Ausbeute: 15mg (10μmol) = 35% der Theorie

R<sub>f</sub> (Chloroform/Methanol = 85/15) = 0,58

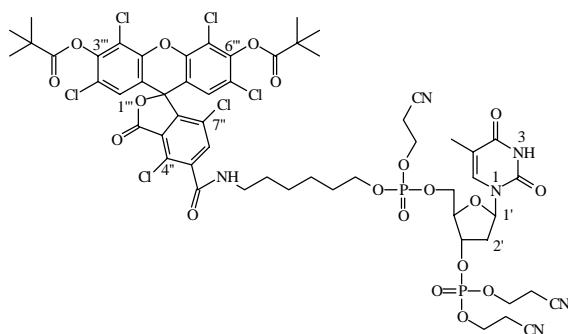
(+)ESI-MS (C<sub>62</sub>H<sub>61</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>7</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>; 1481,16g/mol): m/z=1482,2 [M+H]<sup>+</sup> (90%); m/z=1502,1 [M+Na]<sup>+</sup> (100%)

(+)ESI-DAU (1482,3): m/z=215,9 [gesch- Base]<sup>+</sup> (100%)

(-)ESI-MS: m/z=1482,0 [M-H]<sup>-</sup> (100%); m/z=1518,2 [M+Cl]<sup>-</sup> (40%); m/z=1427,2 [M-Cyanoethyl]<sup>-</sup> (40%)

(-)ESI-DAU (1482,0): m/z=1427,0 [M-Cyanoethyl]<sup>-</sup> (100%)

**5'-O-[[4'',7'',2''',4''',5''',7'''-hexachloro-(3''',6'''-dipivaloylfluoresceinyl)-6''-carbox-amidohexyl]-O-(2-cyanoethyl)phosphatidyl]-2'-desoxythymidin-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 16:**

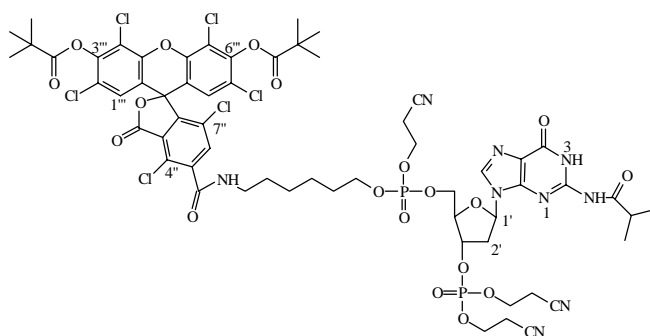


Ausbeute: 23mg (22μmol) = 63% der Theorie

R<sub>f</sub> (Chloroform/Methanol = 85/15) = 0,48

(+)ESI-MS (C<sub>56</sub>H<sub>58</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>; 1393,77g/mol): m/z=1393,3 [M+H]<sup>+</sup> (20%); m/z=1415,2 [M+Na]<sup>+</sup> (100%)

**5'-O-[[4'',7'',2''',4''',5''',7'''-hexachloro-(3''',6'''-dipivaloylfluoresceinyl)-6''-carbox-amidohexyl]-O-(2-cyanoethyl)phosphatidyl]-2'-desoxyguanosin-N<sup>2</sup>-isobutyryl-3'-O-(di-2-cyanoethyl)-phosphat 17:**



Ausbeute: 21mg (14μmol) = 52% der Theorie

R<sub>f</sub> (Chloroform/Methanol = 85/15) = 0,50

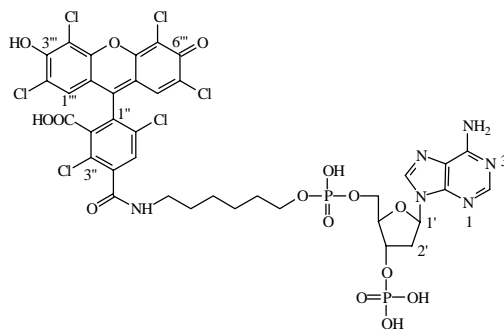
(+)ESI-MS (C<sub>60</sub>H<sub>63</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>9</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>; 1487,17g/mol): m/z=1487,8 [M+H]<sup>+</sup> (20%); m/z=1511,6 [M+Na]<sup>+</sup> (100%)

(-)ESI-MS: m/z=1486,3 [M-H]<sup>-</sup> (10%); m/z=1523,7 [M+Cl]<sup>-</sup> (100%); m/z=1433,3 [M-Cyanoethyl]<sup>-</sup> (20%)

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur vollständigen Entschützung 5'-OH-fluoreszenzmarkierter 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate (18-21):**

8mg vollständig geschützte, Fluorein-markierte 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate **14-17** (~5,5µmol) werden jeweils in 3ml Acetonitril gelöst und bei Raumtemperatur 6 Stunden mit 5ml konzentriertem wäßrigen Ammoniak inkubiert. Danach wird überschüssiges Ammoniak im Vakuum entfernt, 5ml Wasser zugegeben und lyophilisiert. Der erhaltene Niederschlag wird in 2ml Acetonitril/0,1M wäßriges Triethylammoniumacetat (pH=7,0) gelöst und mittels präparativer RP18-HPLC isokratisch (mobile Phase: Acetonitril/0,1M wäßriges Triethylammoniumacetat (pH=7,0) = 2/3; Fluß: 5ml/min) getrennt. Die fluoreszenzspektroskopisch detektierten ( $\lambda_{\text{ex}}=530\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=550\text{nm}$ ) Produktfraktionen werden in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Diesen letzten Schritt wiederholt man zur Entfernung des Triethylammoniumacetats mehrfach.

**5'-O-[(3'',6'',2''',4''',5''',7'''-hexachlorofluoresceinyl-4''-carboxamidohexyl)-phosphatidyl]-2'-desoxyadenosin-3'-O-phosphat **18**:**

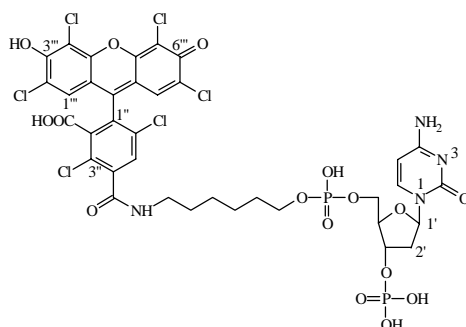


Ausbeute: 3,3mg (3µmol) = 57% der Theorie

(-)ESI-MS ( $\text{C}_{37}\text{H}_{32}\text{Cl}_6\text{N}_6\text{O}_{15}\text{P}_2$ ; 1073,95 g/mol):  $m/z = 1073,5$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  (15%);  $m/z = 536,0$   $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$  (80%);  $m/z = 357,4$   $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$  (100%);  $m/z = 267,4$   $[\text{M}-4\text{H}]^{4-}$  (30%)

(+)ESI-MS:  $m/z = 1074,7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (60%)

**5'-O-[(3'',6'',2''',4''',5''',7'''-hexachlorofluoresceinyl-4''-carboxamidohexyl)-phosphatidyl]-2'-desoxycytidin-3'-O-phosphat **19**:**



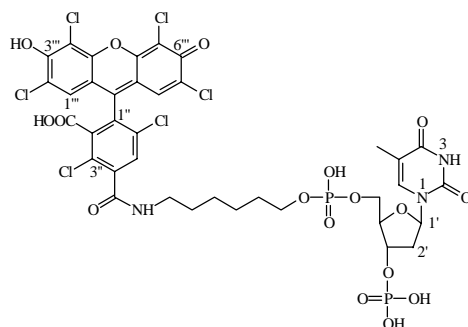


Ausbeute: 1,4mg (1,3μmol) = 25% der Theorie

(-)ESI-MS ( $C_{36}H_{32}Cl_6N_4O_{16}P_2$ ; 1049,94g/mol):  $m/z=1049,1$   $[M-H]^-$  (20%);  $m/z=523,6$   $[M-2H]^{2-}$  (100%);  $m/z=349,0$   $[M-3H]^{3-}$  (40%);  $m/z=260,9$   $[M-4H]^{4-}$  (10%)

(+)ESI-MS:  $m/z=1050,8$   $[M+H]^+$  (20%)

***5'-O-[(3'',6'',2''',4''',5''',7'''-hexachlorofluoresceinyl-4''-carboxamidohexyl)-phosphatidyl]-2'-desoxythymidin-3'-O-phosphat 20:***

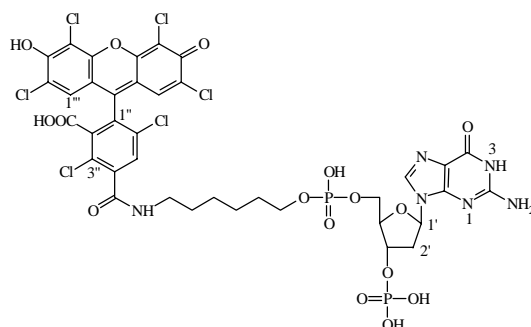


Ausbeute: 3,0mg (2,8μmol) = 50% der Theorie

(-)ESI-MS ( $C_{37}H_{33}Cl_6N_3O_{17}P_2$ ; 1064,94g/mol);  $m/z=1063,8$   $[M-H]^-$  (2%);  $m/z=531,2$   $[M-2H]^{2-}$  (70%);  $m/z=354,2$   $[M-3H]^{3-}$  (80%);  $m/z=265,6$   $[M-4H]^{4-}$  (100%)

$^1H$ -NMR (500MHz,  $D_2O$ ):  $\delta=7,84$  (s, 1  $H_{4''}$ );  $\delta=7,41$  (d, 1  $H_6$ );  $\delta=7,32$  und  $7,28$  (s, 1  $H_{1''''}$  und 1  $H_{8''''}$ );  $\delta=6,10$  (dd, 1  $H_{1'}$ );  $\delta=3,95$  (m, 1  $H_{4'}$ );  $\delta=2,50$  (m, 1  $H_{2'}$ );  $\delta=2,15$  (m, 1  $H_{2'}$ );  $\delta=1,75$  (d, 3  $CH_3$ );  $\delta=2,95-3,90$  und  $4,05-4,15$  (m,  $12 -CH_2-$  und 2  $H_{5'}$ ); das Signal für  $H_{3'}$  ist von  $D_2O$  überlagert;

***5'-O-[(3'',6'',2''',4''',5''',7'''-hexachlorofluoresceinyl-4''-carboxamidohexyl)-phosphatidyl]-2'-desoxyguanosin-3'-O-phosphat 21:***



Ausbeute: 1,7mg (1,6μmol) = 31% der Theorie

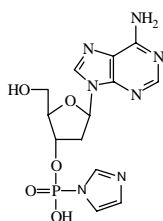
(-)ESI-MS ( $C_{37}H_{32}Cl_6N_6O_{16}P_2$ ; 1089,95g/mol);  $m/z=1089,2$   $[M-H]^-$  (2%);  $m/z=544,2$   $[M-2H]^{2-}$  (40%);  $m/z=362,1$   $[M-3H]^{3-}$  (100%);  $m/z=271,1$   $[M-4H]^{4-}$  (40%)

(+)ESI-MS:  $m/z=1090,5$   $[M+H]^+$  (5%)

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-3'-O-phosphorimidazoliden (34-37):**

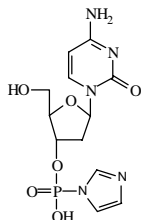
1mg 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate **22-25** (~3μmol) werden jeweils in 20μl Dimethylsulfoxid (im Fall von 2'-Desoxycytidin-3'-phosphat **23** in 35μl Wasser) gelöst und mit 300μl einer jeweils 1M methanolischen Lösung von Dicyclohexylcarbodiimid und Imidazol versetzt. Nach 1 Stunde Schütteln bei Raumtemperatur wird die Lösung lyophilisiert und in 1ml Wasser aufgenommen. Der dabei entstehende Niederschlag wird abfiltriert und die Lösung tiefgefroren.

**2'-Desoxyadenosin-3'-O-phosphorimidazolid **34**:**



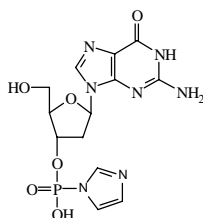
(-)ESI-MS ( $C_{13}H_{16}N_7O_5P$ ; 381,28g/mol):  $m/z=379,8$   $[M-H]^-$  (100%)

**2'-Desoxycytidin-3'-O-phosphorimidazolid **35**:**



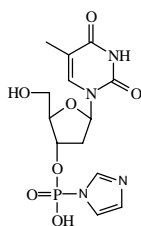
(-)ESI-MS ( $C_{12}H_{16}N_5O_6P$ ; 357,26g/mol);  $m/z=355,7$   $[M-H]^-$  (100%)

**2'-Desoxyguanosin-3'-O-phosphorimidazolid **36**:**



(-)ESI-MS ( $C_{13}H_{16}N_7O_6P$ ; 397,28g/mol):  $m/z=395,7$   $[M-H]^-$  (100%)

**2'-Desoxythymidin-3'-O-phosphorimidazolid 37:**

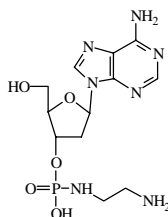


(-)-ESI-MS ( $C_{13}H_{17}N_4O_7P$ ; 372,27g/mol):  $m/z=370,7$   $[M-H]^-$  (100%)

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-3'-O-(ethylendiamin)-phosphoramidaten (38-41):**

1mg 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphate **22-25** ( $\sim 3\mu\text{mol}$ ) werden jeweils in 20 $\mu\text{l}$  Dimethylsulfoxid (im Fall von 2'-Desoxycytidin-3'-phosphat **23** in 35 $\mu\text{l}$  Wasser) gelöst und mit 300 $\mu\text{l}$  einer jeweils 1M methanolischen Lösung von Dicyclohexylcarbodiimid und Imidazol versetzt. Nach 1 Stunde Schütteln bei Raumtemperatur werden jeweils 320 $\mu\text{l}$  0,63M methanolischer Ethylendiamin-Lösung, die mit 0,1M Salzsäure auf einen pH-Wert=7,5 eingestellt wurde, zugegeben. Der dabei gebildete Niederschlag wird abfiltriert und die Reaktionslösung 3 Stunden bei 55°C geschüttelt. Nach Lyophilisation der Reaktionsansätze werden 500 $\mu\text{l}$  Wasser zugegeben und der gebildete Niederschlag filtriert. Diese Lösungen werden mittels präparativer RP18-HPLC (mobile Phase: Acetonitril/5mM Essigsäure; Fluß: 5ml/min) getrennt und die bei 254nm detektierten Produktfraktionen lyophilisiert.

**2'-Desoxyadenosin-3'-O-(ethylendiamin)-phosphoramidat 38:**

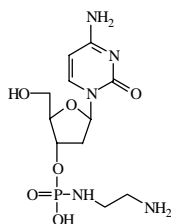


Ausbeute: 0,9mg ( $2,4\mu\text{mol}$ ) = 80%

(-)-ESI-MS ( $C_{12}H_{20}N_7O_5P$ ; 373,30g/mol):  $m/z=372,0$   $[M-H]^-$  (20%)

(+)-ESI-MS:  $m/z=373,9$   $[M+H]^+$  (80%)

**2'-Desoxycytidin-3'-O-(ethylendiamin)-phosphoramidat 39:**

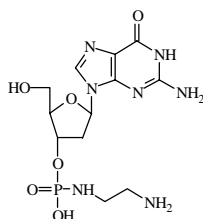


Ausbeute: 0,8mg (2,3 $\mu$ mol) = 75%

(-)ESI-MS (C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>P; 349,28g/mol): m/z=348,0 [M-H]<sup>-</sup> (100%); m/z=694,2 [2M-H]<sup>-</sup> (30%); m/z=719,1 [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (20%)

(+)ESI-MS: m/z=350,0 [M+H]<sup>+</sup> (100%); m/z=699,4 [2M+H]<sup>+</sup> (10%); m/z=718,3 [2M-NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (10%)

**2'-Desoxyguanosin-3'-O-(ethylendiamin)-phosphoramidat 40:**

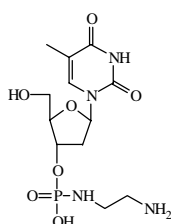


Ausbeute: 1mg (2,7 $\mu$ mol) = 90%

(-)ESI-MS (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>P; 389,30g/mol): m/z=387,9 [M-H]<sup>-</sup> (100%); m/z=193,5 [M-2H]<sup>2-</sup> (30%); m/z=777,5 [2M-H]<sup>-</sup> (10%)

(+)ESI-MS: m/z=390,0 [M+H]<sup>+</sup> (100%); m/z=412,0 [M+Na]<sup>+</sup> (50%)

**2'-Desoxythymidin-3'-O-(ethylendiamin)-phosphoramidat 41:**

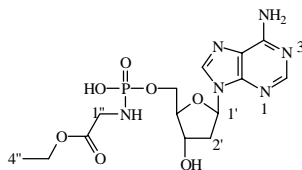


Ausbeute: 1mg (2,7 $\mu$ mol) = 90%

(-)ESI-MS (C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>P; 364,29g/mol): m/z=362,9 [M-H]<sup>-</sup> (100%); m/z=180,8 [M-2H]<sup>2-</sup> (30%); m/z=726,6 [2M-H]<sup>-</sup> (20%)

(+)ESI-MS: m/z=364,9 [M+H]<sup>+</sup> (100%); m/z=387,0 [M+Na]<sup>+</sup> (80%)

**Arbeitsvorschrift zur Darstellung von 2'-Desoxyadenosin-5'-O-(glycinethylester)-phosphoramidat (45):**



2mg 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat **43** (6mmol) werden in 6ml 100mM HEPES-Puffer, pH=6,5 gelöst. Zu dieser 1mM-Lösung werden mit jeweils 6ml einer Lösung von Glycinethylester **44** (50mM in 100mM HEPES-Puffer, pH=6,5) und EDC (300mM in 100mM HEPES-Puffer, pH=6,5) zugegeben. Nach Schütteln über Nacht bei 35°C wird diese Reaktionslösung mittels präparativer RP18-HPLC (mobile Phase: a) 20min Wasser; b) innerhalb der folgenden 15min auf 10% Acetonitril: Fluß: 5ml/min) getrennt und die bei 256nm detektierten Produktfraktionen lyophilisiert.

Ausbeute: 2,4mg (5,9mmol) = 98%

(-)ESI-MS ( $C_{14}H_{21}N_6O_7P$ ; 416,33g/mol):  $m/z=415,1$   $[M-H]^-$  (100%)

(-)ESI-DAU (415,1):  $m/z=133,9$   $[Base]^-$  (100%)

(+)ESI-MS:  $m/z=417,0$   $[M+H]^+$  (100%);  $m/z=439,0$   $[M+Na]^+$  (60%);  $m/z=833,3$   $[2M-H]^+$  (5%);  $m/z=855,3$   $[2M+Na]^+$  (5%)

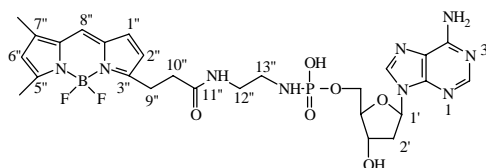
(+)ESI-DAU (417,0):  $m/z=135,8$   $[Base]^+$  (100%)

$^1H$ -NMR (500MHz,  $D_2O$ ):  $\delta=8,29$  (s, 1 **H8**);  $\delta=8,10$  (s, 1 **H2**);  $\delta=6,34$  (dd, 1 **H1'**);  $\delta=4,15$  (q, 2 **H3''**);  $\delta=4,08$  (ddd, 1 **H3'**);  $\delta=4,82$  (m, 2 **H5'** und 1 **H4'**);  $\delta=3,23$  (d, 2 **H1''**);  $\delta=2,72$  (dddd, 1 **H2'**);  $\delta=2,45$  (ddd, 1 **H2''**);  $\delta=0,93$  (t, 3 **H4''**)

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-BODIPY-phosphoramidaten (49-56):**

2mg 2'-Desoxynukleosid-5'-phosphat **43**, **46-48** (6mmol) bzw. 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphat **22-25** werden in 6ml 100mM HEPES-Puffer, pH=6,5 gelöst. 100µl dieser 1mM-Lösung werden mit jeweils 100µl einer Lösung von Glycinethylester **44** (50mM in 100mM HEPES-Puffer, pH=6,5) und EDC (300mM in 100mM HEPES-Puffer, pH=6,5) versetzt. Nach Schütteln über Nacht bei 35°C wird diese Reaktionslösung mittels präparativer RP18-HPLC (mobile Phase: innerhalb von 30min linear von 5% Acetonitril auf 65% Acetonitril in 0,1M Triethylammoniumacetat, pH=7,0; Fluß: 5ml/min) getrennt und die fluoreszenzspektroskopisch detektierten ( $\lambda_{ex}=500nm$ ,  $\lambda_{em}=510nm$ ) Produktfraktionen lyophilisiert.

**2'-Desoxyadenosin-5'-(BODIPY)-phosphoramidat 49:**



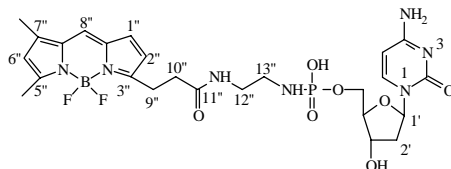
Ausbeute:  $6 \cdot 10^{-6}$  g ( $1 \cdot 10^{-8}$  mol) = 10%

(-)ESI-MS ( $C_{26}H_{33}BF_2N_9O_6P$ ; 647,38g/mol):  $m/z=646,0$   $[M-H]^-$  (100%)

(-)ESI-DAU (646,0):  $m/z=625,7$   $[M-HF]^-$  (30%);  $m/z=605,8$   $[M-2HF]^-$  (100%)

(+)ESI-MS:  $m/z=648,1$   $[M+H]^+$  (Spuren);  $m/z=670,0$   $[M+Na]^+$  (Spuren)

**2'-Desoxycytidin-5'-(BODIPY)-phosphoramidat 50:**



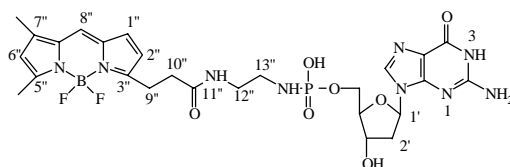
Ausbeute:  $15 \cdot 10^{-6}$  g ( $2,4 \cdot 10^{-8}$  mol) = 24%

(-)ESI-MS ( $C_{25}H_{33}BF_2N_7O_7P$ ; 623,36g/mol):  $m/z=622,1$   $[M-H]^-$  (100%)

(-)ESI-DAU (622,2):  $m/z=602,0$   $[M-HF]^-$  (60%);  $m/z=581,9$   $[M-2HF]^-$  (100%)

(+)ESI-MS:  $m/z=646,0$   $[M+Na]^+$  (Spuren)

**2'-Desoxyguanosin-5'-(BODIPY)-phosphoramidat 51:**

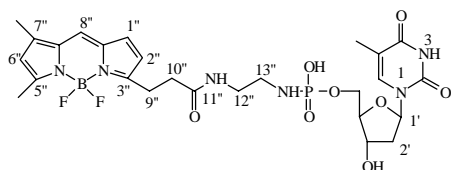


Ausbeute:  $11 \cdot 10^{-6}$  g ( $1,7 \cdot 10^{-8}$  mol) = 17%

(-)ESI-MS ( $C_{26}H_{33}BF_2N_9O_7P$ ; 663,38g/mol):  $m/z=662,2$   $[M-H]^-$  (100%)

(-)ESI-DAU (662,0):  $m/z=642,0$   $[M-HF]^-$  (40%);  $m/z=622,0$   $[M-2HF]^-$  (100%)

**2'-Desoxythymidin-5'-(BODIPY)-phosphoramidat 52:**



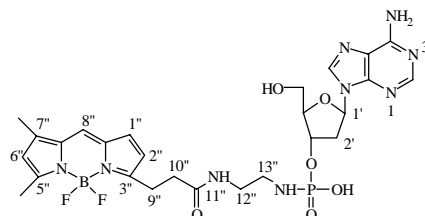
Ausbeute:  $15 \cdot 10^{-6}$  g ( $2,4 \cdot 10^{-8}$  mol) = 24%

(-)ESI-MS ( $C_{26}H_{34}BF_2N_6O_8P$ ; 638,37g/mol):  $m/z=637,1$   $[M-H]^-$  (100%)

(-)ESI-DAU (637,1):  $m/z=616,9$   $[M-HF]^-$  (90%);  $m/z=596,9$   $[M-2HF]^-$  (100%)

(+)ESI-MS:  $m/z=639,2$   $[M+H]^+$  (50%);  $m/z=661,1$   $[M+Na]^+$  (100%)

**2'-Desoxyadenosin-3'-(BODIPY)-phosphoramidat 53:**



Ausbeute:  $23 \cdot 10^{-6} \text{g}$  ( $3,4 \cdot 10^{-8} \text{mol}$ ) = 34%

(-)ESI-MS ( $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{BF}_2\text{N}_9\text{O}_6\text{P}$ ; 647,38g/mol):  $m/z=645,9$   $[M-H]^-$  (100%);  $m/z=1293,3$   $[2M-H]^-$  (10%);  $m/z=1315,3$   $[2M-2H+Na]^-$  (5%)

(-)ESI-DAU (645,9):  $m/z=605,9$   $[M-HF]^-$  (100%);  $m/z=587,8$   $[M-2HF]^-$  (30%)

(+)ESI-MS: 648,1  $[M+H]^+$  (60%);  $m/z=670,0$   $[M+Na]^+$  (20%)  $m/z=1295,5$   $[2M+H]^+$  (15%)

(+)ESI-DAU (648,1):  $m/z=493,01$   $[M-HF-Base]^*$  (100%);  $m/z=395,2$   $[M-HF-Nukleosid]^+$  (100%)

Tab. 16:  $^1\text{H}$ -Kopplungskonstanten in Hz von **53** im Vergleich zu **22** und **42**

Pos.	Partner	3'-dA-BODIPY (53)	BODIPY-EDA (42)	3'-dA (22)
1''	2''		3,9	
9''a,b	10''a,b	8,4; 6,9 (AA'XX')	9,2; 6,5 (AA'XX')	
12''a,b	13''a,b	6,16 (t)	6,8; 5,2 (AA'XX')	
12''a,b	P (?)	3,4		
13''a,b	P	10,5		
1'	2'a; 2'b	8,25; 5,85		7,97; 5,93
2'a	2'b; 3'; P(?)	-13,56; 5,75; 0,52		-13,5; 5,74; 0,7
2'b	3'	2,44		2,74
3'	4'; P	2,3; 8,1		2,5; 7,8
4'	5'a; 5'b,	2,89; 3,04		3,1; 2,9
5'a	5'b	-12,37		-12,68

Tab. 17:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten (chemische Verschiebung) von **53** im Vergleich zu **22** und **42**

13C Shifts ( $\text{CD}_3\text{OD} = 49,0 \text{ ppm}$ )				$^1\text{H}$ Shifts ( $\text{CHD}_2\text{OD} = 3,30 \text{ ppm}$ )			
Pos. (Mult.)	3'-dA- BODIPY (53)	BODIPY- EDA (42) (HCl Salz)	3'-dA (22) ( $\text{NH}_4^+$ Salz)	Pos. (Mult.)	3'-dA- BODIPY (53)	BODIPY- EDA (42) (HCl Salz)	3'-dA (22) ( $\text{NH}_4^+$ Salz)
1'' (d) <sup>e</sup>	129,665	129,582		1'' (d)	6,981	7,003	
2'' (d) <sup>e</sup>	117,700 <sup>a</sup>	117,552		2'' (d)	6,317	6,326	
3'' (s) <sup>e</sup>	158,702	158,257					
5'' (s) <sup>e</sup>	161,171	161,478					
5''-Me (q) <sup>e</sup>	14,843	14,836		5''-Me (s)	<sup>c</sup> 2,474	2,499	
6'' (d) <sup>e</sup>	121,250	121,433		6'' (s)	6,166	6,208	
7'' (s) <sup>e</sup>	145,678	145,988					
7''-Me (q)	11,163	11,164		7''-Me (s)	2,254	2,270	
7''a (s) <sup>e</sup>	136,476	136,606		8'' (s)			
8'' (d) <sup>e</sup>	125,732	125,809			7,381	7,422	
8''a (s) <sup>e</sup>	134,910	134,898					
9'' (t) <sup>e</sup>	25,609	25,366		9''a,b (t) <sup>d</sup>	3,211	3,227	
10'' (t) <sup>e</sup>	35,989	35,871		10''a,b (t) <sup>d</sup>	2,623	2,666	
11'' (s)	174,781	176,033					
12'' (t) ( $^3J_{\text{CP}}$ )	42,790 (5,80)	38,298		12''a,b	3,277 (dt)	3,448(t) <sup>d</sup>	
13'' (t)	42,033	41,026		13''a,b	2,992 (dt)	3,041(t) <sup>d</sup>	
1' (d)	87,340		87,316	1' (dd)	6,412		6,429
2' (t) ( $^3J_{\text{CP}}$ )	40,661 (3,95)		40,623 (4,14)	2'a (dddd) 2'b (ddd)	2,854 2,603		2,854 2,662
3' (d) ( $^2J_{\text{CP}}$ )	76,321 (5,25)		76,874 (5,11)	3' (dddd)	4,928		4,977
4' (d) ( $^3J_{\text{CP}}$ )	89,105 (5,11)		89,055 (5,35)	4' (ddd)	4,273		4,295
5' (t)	63,687		63,678	5'a (dd) 5'b (dd)	3,837 3,801		3,859 3,817
2 (d)	153,442		153,461	2 (s)	8,149		8,164
4 (s)	150,001		150,004				
5 (s)	120,924		120,930				
6 (s)	157,480		157,530				
8 (d)	141,711		141,677	8 (s)	8,307		8,334

<sup>a</sup> zus. Aufspaltung  $J = 1,9 \text{ Hz}$ ; <sup>c</sup> langsamer Deuterium-Austausch ( $t_{1/2} = \text{ca. } 2,5 \text{ Tage}$ ); <sup>d</sup> pseudo triplet (AA'XX' System); <sup>e</sup> breite Resonanz, zeigen teilweise Multipllettstruktur.



Tab. 18:  $^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten in Hz von **53** im Vergleich zu **22**

Pos.	Partner	3'-dA-BODIPY (53)	3'-dA (22)
2'	P	4,0	4,1
3'	P	5,3	5,1
4'	P	5,1	5,4
13''	P	5,8	
2	H2		201,1
5	H8		11,0
5	H2		1,2
6	H2		11,0
8	H8		213,9
8	H1'		3,6

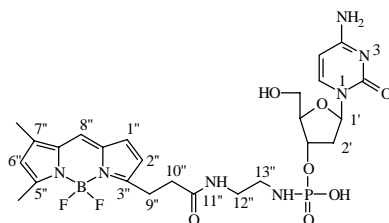
Tab. 19:  $^{11}\text{B}$ -NMR-Daten von **53** im Vergleich zu **42**

	BODIPY-EDA (42)	3'-dA-BODIPY (53)
$\Xi$ ( $\text{BF}_2$ ) (MHz) rel. TMS = 100,0	32,0840024	32,0840010
$^{11}\text{B}$ Linewidth (Hz)	7,3	7,0
$^1J_{\text{BF}}$ (Hz)	33,0	33,5

Tab. 20:  $^{19}\text{F}$ -NMR-Daten von **53** im Vergleich zu **42**:

	BODIPY-EDA (42) - $\text{BF}_2^-$	3'-dA-BODIPY (53) - $\text{BF}_2^-$
$\delta_{\text{F}}$ (ppm)	-69,873	-70,873
$^1J_{\text{BF}}$ (Hz)	32,6	32,8

**2'-Desoxycytidin-3'-(BODIPY)-phosphoramidat 54:**



Ausbeute:  $15 \cdot 10^{-6} \text{ g}$  ( $2,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$ ) = 26%

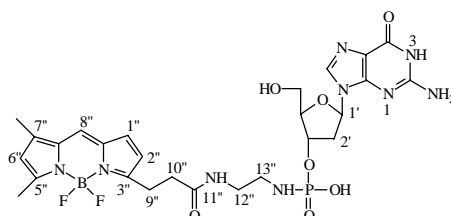
(-)-ESI-MS ( $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{BF}_2\text{N}_7\text{O}_7\text{P}$ ; 623,36g/mol):  $m/z=622,2$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  (100%);  $m/z=1245,9$   $[2\text{M}-\text{H}]^-$  (10%)

(-)-ESI-DAU (622,1):  $m/z=601,8$   $[\text{M}-\text{HF}]^-$  (80%);  $m/z=581,9$   $[\text{M}-2\text{HF}]^-$  (100%)

(+)ESI-MS:  $m/z=624,1$   $[M+H]^+$  (60%);  $m/z=646,0$   $[M+Na]^+$  (40%);  $m/z=1247,5$   $[2M+H]^+$  (5%);  $m/z=1269,0$   $[2M+Na]^+$  (5%)

(+)ESI-DAU (624,1):  $m/z=395,0$   $[M-HF-Base]^+$  (100%);  $m/z=493,0$   $[M-HF-Nukleosid]^+$  (40%)

**2'-Desoxyguanosin-3'-(BODIPY)-phosphoramidat 55:**



Ausbeute:  $16 \cdot 10^{-6} \text{g}$  ( $2,4 \cdot 10^{-8} \text{mol}$ ) = 24%

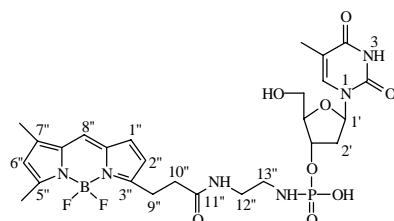
(-)ESI-MS ( $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{BF}_2\text{N}_9\text{O}_7\text{P}$ ; 663,38g/mol):  $m/z=662,0$   $[M-H]^-$  (100%);  $m/z=1325,8$   $[2M-H]^-$  (5%)

(-)ESI-DAU (662,0):  $m/z=641,8$   $[M-HF]^-$  (70%);  $m/z=622,1$   $[M-2HF]^-$  (100%)

(+)ESI-MS:  $m/z=663,9$   $[M+H]^+$  (20%);  $m/z=686,0$   $[M+Na]^+$  (50%);  $m/z=1350,0$   $[2M+H]^+$  (10%);  $m/z=1371,7$   $[2M+Na]^+$  (5%)

(+)ESI-DAU (663,9):  $m/z=394,9$   $[M-HF-Base]^+$  (100%);  $m/z=493,1$   $[M-HF-Nukleosid]^+$  (80%)

**2'-Desoxythymidin-3'-(BODIPY)-phosphoramidat 56:**



Ausbeute:  $16 \cdot 10^{-6} \text{g}$  ( $2,4 \cdot 10^{-8} \text{mol}$ ) = 24%

(-)ESI-MS ( $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{BF}_2\text{N}_6\text{O}_8\text{P}$ ; 638,37g/mol):  $m/z=636,9$   $[M-H]^-$  (100%)

(-)ESI-DAU (636,9):  $m/z=617,1$   $[M-HF]^-$  (70%);  $m/z=597,0$   $[M-2HF]^-$  (100%)

(+)ESI-MS:  $m/z=661,4$   $[M+Na]^+$  (10%)

## 6.3 <sup>32</sup>P-postlabeling-Analysen

### ***Bestimmung der DNA-Konzentration***

Aliquots der DNA-Lösungen werden 1:50 mit Wasser verdünnt und die UV-Extinktionen bei 260, 280 und 320nm bestimmt. Die Extinktion bei 320nm wird als Korrekturfaktor von der Extinktion bei 280nm subtrahiert. Für reine DNA liegt der Quotient OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub> bei 1,8. Die DNA-Konzentration ergibt sich aus:

$$2.15 \quad c(\text{DNA}) [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnung}$$

### ***Enzymatische DNA-Hydrolyse***

Durch Verwendung von Mikrokokken-Nuklease (MN) und Phosphodiesterase aus Kalbsmilz (SPD) wird DNA zu 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten hydrolysiert. Je Probe werden Aliquots der DNA-Proben, die 12,5µg DNA enthalten, im Vakuum zur Trockene eingengt und in 6,5µl destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 1µl des Standard-Verdau-Puffers (100mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM Natriumsuccinat, pH=6,0) oder des für die Fluoreszenzderivatisierung angepaßte Verdau-Puffers (100mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM HEPES, pH=6,0) zugegeben. Diese Lösung wird mit 5µl MN/SPD-MIX bestehend aus 2,5mU/µl SPD und 150µU/µl MN versetzt. Die Lösung wird 3h bei 37°C inkubiert.

### ***Radioaktiv-Markierung***

2,5µl des enzymatischen DNA-Verdaus werden 1:1500 verdünnt. Dazu werden 2,5µl des Hydrolysats zu 247µl Wasser gegeben. Dann werden 10µl dieser Lösung zu 140µl Wasser pipettiert. 5µl dieser 1:1500-Verdünnung werden zu 2,5µl TRIS-Puffer (10mM, pH=9) gegeben. Zu dieser Nukleotid-Lösung (Volumen 7,5µl) werden 2,5µl eines frisch hergestellten „Label-Mix“, bestehend aus 1µl Kinase-Puffer (200mM Biscin, 100mM DTT, 100mM Magnesiumchlorid, 10mM Spermidin, pH=9,5), 0,5µl ATP (90µM), 0,34µl T4-PNK (30U/µl) 100µCi [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (Volumen abhängig von Aktivität) und Wasser (Differenz zu 2,5µl) zugegeben. Zu beachten ist dabei, daß die Kinase als letztes dem „Label-Mix“ beigefügt wird. Die Inkubationsdauer beträgt 30min bei Raumtemperatur.

### ***Chromatographische Trennung***

4µl der Lösung der markierten Nukleotide werden entnommen und mit 750µl TRIS-Puffer (10mM, pH=9,0) verdünnt. Von dieser Verdünnung werden je Probe 5µl 2cm vom unteren

Rand entfernt auf eine gemeinsame PEI-Cellulose-DC-Folie nebeneinander aufgetragen. Die Entwicklung erfolgt eindimensional in 0,28M NH<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=6,5. Nach Trocknung im Warmluftstrom wird die Radioaktivität mit einem Phosphor-Imager gemessen.

#### **6.4 Fluoreszenzmarkierung enzymatischer DNA-Hydrolysate**

##### ***Bestimmung der DNA-Konzentration***

Die DNA-Konzentration genomischer DNA wurde entsprechend Gleichung 2.15 ermittelt. Im Fall von Oligonukleotiden erfolgt die Bestimmung der Konzentration nach:

$$2.16 \quad c(\text{DNA}) [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \cdot 30 \cdot \text{Verdünnung}$$

##### ***Enzymatische DNA-Hydrolyse***

Durch Verwendung von Mikrokokken-Nuklease (MN) und Phosphodiesterase aus Kalbsmilz (SPD) wird DNA zu 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten hydrolysiert. Je Probe werden Aliquots der DNA-Proben, die 10μg DNA enthalten, im Vakuum zur Trockene eingengt und in 5,2μl destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,8μl des für die Fluoreszenzderivatisierung angepaßten Verdau-Puffers (100mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM HEPES, pH=6,0) zugegeben. Diese Lösung wird mit 4μl MN/SPD-MIX bestehend aus 2,5mU/μl SPD und 150μU/μl MN versetzt. Die Lösung wird 3h bei 37°C inkubiert.

##### ***Fluoreszenzderivatisierung von 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphaten aus enzymatischer DNA-Hydrolyse***

Das DNA-Hydrolysat (Volumen 10μl) wird mit 20μl 100mM HEPES-Puffer, pH=6,5 versetzt. Zu diesen 30μl Nukleotid-Lösung werden 30μl 25mM Fluoreszenzmarker (BODIPY-EDA **42**) in 100mM HEPES, pH=6,5 und 300mM Aktivator (EDC) in 100mM HEPES, pH=6,5 zugegeben. Diese Reaktionslösung wird 16h bei 37°C unter schütteln inkubiert. Nach beendeter Reaktion werden je nach erwarteter Konzentration an modifizierten Nukleotiden entsprechende Verdünnungen dieser Lösung mit Wasser hergestellt (1:10000 zur Bestimmung der unmodifizierten Nukleotide bzw. von DNA-Addukten aus Oligonukleotiden; 1:10 zur Bestimmung von DNA-Addukten aus genomischer DNA) und sofort kapillarelektrophoretisch untersucht.

## **6.5 Kapillarelektrophoretische Trennung fluoreszenzmarkierter Nukleotide**

### ***Trennpuffer***

Zur Trennung fluoreszenzmarkierter Nukleotide in unbeschichteten fused-silica-Kapillaren mittels MEKC kommt ein Elektrolyt bestehend aus 17mM Natriumphosphat-Puffer, pH=9,0, 75mM SDS als Micellenbildner und 15% Methanol zum Einsatz.. Dazu werden in 100ml eines 20mM Natriumphosphat-Puffers, pH=9,0 2,16g SDS gelöst. 85ml dieser Lösung werden anschließend mit 15ml Methanol versetzt.

### ***Probenaufgabe***

Die entsprechend verdünnten Derivatisierungslösungen werden hydrodynamisch mit 10psi-s auf die Kapillare aufgegeben. Unter Berücksichtigung der Kapillardimensionen und der Pufferviskosität ergibt sich nach Gleichung 2.11 ein Injektionsvolumen von ca. 2nl.

### ***Trennspannung***

Die Trennspannung beträgt 20kV, was bei einer Kapillarlänge von 50cm 400V/cm entspricht. In allen Trennung war die Kathode das Outlet.

### ***Trennkapillare***

Als Trennkapillare diente in allen Fällen eine unbeschichtete fused-silica-Kapillare der Gesamtlänge 50cm (effektive Länge bis zum Detektionsfenster = 45,4cm) mit einem Durchmesser von 50µm.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] N. Becker und J. Wahrendorf; "Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland"  
*Springer-Verlag, Heidelberg, (1998)*
- [2] F. P. Perera; Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment and prevention  
*J. Natl. Cancer Inst., 88(1996), 496-509*
- [3] H. Marquardt in H. Marquardt und S. G. Schäfer (Editors) in „Lehrbuch der Toxikologie“  
*Mannheim, BI Wissenschaftsverlag (1994) 124-147*
- [4] K. Hemminki; DNA adducts, mutations and cancer  
*Carcinogenesis, 14(1993), 2007-2012*
- [5] F. P. Perera und I. B. Weinstein; Molecular epidemiology: recent advantages and future directions  
*Carcinogenesis, 21(2000), 517-524*
- [6] M. V. Reddy und K. Randerath; Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts  
*Carcinogenesis 7(1986) 1543-1551*
- [7] F. G. Guengerich; Metabolic activation of carcinogens  
*Pharmac. Ther., 54(1992) 17-61*
- [8] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs; Zone-electrophoresis in open-tubular glass capillaries  
*Analyt. Chem., 53(1981) 1298-1302*
- [9] P. Pott; Chirurgische observations relative to the cancer of the scrotum  
L. Hawes, W. Clark und R. Collins, London (1775)
- [10] K. Yamagiva und K. Ischikawa; Experimental study of the pathogenesis of carcinoma  
*J. Cancer Res., 3(1918) 1-21*
- [11] C. Auerbach, J. M. Robson und J. G. Carr; The chemical production of mutations  
*Science, 105(1947) 243-247*
- [12] J. A. Miller; Carcinogenesis by chemicals: an overview  
*Cancer Res., 30(1970) 559-576*
- [13] F. P. Guengerich; Metabolism of chemical carcinogens  
*Carcinogenesis, 21(2000) 345-351*
- [14] E. Kriek, M. Rojas, K. Alexandrov und H. Bartsch; Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk  
*Mut. Res., 400(1998) 215-231*
- [15] D. H. Philips; Fifty years of benzo[a]pyrene  
*Nature, 303(1983) 486-472*
- [16] G. Talaska, A. Z. S. S. Al-Juburi und F. F. Kadlubar; Smoking related carcinogen-DNA-adducts in biopsy samples of human urinary bladder: Identification of N-(deoxyguanosin-8-yl-4-aminobiphenyl as a major adduct  
*PNAS, 88(1991) 5350-5354*
- [17] D. Lin, J. O. Lay, M. S. Bryant, C. Malaveille, M. Fiesen, H. Bartsch, N. P. Lang und F. F. Kadlubar; Analysis of 4-Aminobiphenyl-DNA adducts in human urinary-bladder and lung by alkaline-hydrolysis and negative-ion gas-chromatography mass-spectrometry  
*Environ. Health Perspect., 102(1994) 11-16*
- [18] K. R. Kaderlik, G. Talaska, D. G. DeBord, A. M. Osorio und F. F. Kadlubar; 4,4'-Methylene-bis(2-Chloroaniline)-DNA adduct analysis in human exfoliated urothelial cells by P-32 postlabeling

- [19] P. N. Magee und J. M. Barnes; The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine  
*Br. J. Cancer*, 10(1956) 114-122
- [20] J. D. Groopman, P. R. Donahue, J. Zhu, J. Chen und G. N. Wogan; Aflatoxin metabolism in humans: detection of aflatoxin metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography  
*PNAS*, 82(1985) 6492-6497
- [21] J. M. Bishop; Molecular themes in oncogenesis  
*Cell*, 64(1991) 235-248
- [22] H. Bartsch in J. Higginson, C. S. Muir, N. Munoz (Editors): „Human cancer: epidemiology and environmental causes“  
*Cambridge Univ. Press, New York* (1992) 189-208
- [23] K. Frenkel; Carcinogen mediated oxidant formation and oxidative DNA damage  
*Pharmakol. Ther.*, 53(1992) 127-166
- [24] F. P. Perera; Perspectives on the risk assessment for nongenotoxic carcinogens and tumor promoters  
*Environ. Health Perspect.*, 94(1991) 231-235
- [25] D. L. Davis, H. L. Bradlaw, M. Wolff, T. Woodruff, D. G. Hoel und H. Anton-Culver; Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer  
*Environ. Health Perspect.*, 101(1993) 373-377
- [26] I. Berenblum und P. Shubik; An experimental study of the initiating state of carcinogenesis and a re-examination of the somatic cell theory of cancer  
*Br. J. Cancer*, 3(1949) 109-118
- [27] C. C. Harris; Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s  
*Cancer Res. (suppl.)*, 18(1991) 5023s-5044s
- [28] I. B. Weinstein, R. M. Santella und F. P. Perera in P. Greenwald, B. S. Kramer, D. L. Weed (Editors): „Cancer prevention and control“  
*New York; Marcel-Dekker*, (1995) 83-110
- [29] S. Venitt; Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer  
*Clin. Chem.*, 40(1994) 1421-1425
- [30] J. C. Barnett in H. Vainio, P. N. Magee, D. B. McGregor und A. J. McMichael (Editors): „Mechanisms of carcinogenesis in risk identification“  
*IARC, Lyon*, (1992) 115-134
- [31] I. B. Weinstein; The Origins of Human Cancer - Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment - 27th Clowes, G.H.A. Memorial Award Lecture  
*Cancer Res.*, 48(1988) 4135-4143
- [32] R. A. Weinberg in „Spektrum der Wissenschaft Spezial 5: Krebsmedizin“  
*Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg* (1999) 7-17
- [33] F. Oesch in H. Marquard und S. G. Schäfer (Editors) in „Lehrbuch der Toxikologie“  
*BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich* (1994) 68-93
- [34] P. Brookes und P. D. Lawley; Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxynucleic acid  
*Nature*, 202(1964) 781-784
- [35] B. Singer und J. M. Essigmann; Site-specific mutagenesis - retrospective and prospective

- Carcinogenesis, 12(1991) 949-955
- [36] E. L. Loechler; The role of adduct site-specific mutagenesis in understanding how carcinogen-DNA adducts cause mutations - perspective, prospects and problems  
Carcinogenesis, 17(1996) 895-902
  - [37] M. S. Greenblatt, W. P. Bennett, M. Hollstein und C. C. Harris; Mutations in the p53 tumor-suppressor gene - clues to cancer etiology and molecular pathogenesis  
Mut. Res., 54(1994) 4855-4878
  - [38] B. Ruggeri, M. DiRado, S. Y. Zhang, B. Bauer, T. Goodrow und A. J. P. Klein-Szanto; Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G-to-T mutations in the p53-gene  
PNAS, 90(1991) 1013-1017
  - [39] A. K. Basu und J. M. Essigmann; Site-specifically modified oligodeoxynucleotides as probes for the structural and biological effects of DNA-damaging agents  
Chem. Res. Toxicol., 1(1988) 1-18
  - [40] J. A. Ross und S. Nesnow; Polycyclic aromatic hydrocarbons - correlations between DNA-adducts and ras oncogene mutations  
Mut. Res., 424(1999) 155-166
  - [41] P. C. Burcham; Internal hazards - base-line DNA-damage by endogenous products of normal metabolism  
Mut. Res., 443(1999) 11-36
  - [42] International Agency for Research on Cancer (IARC), „IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7: Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Vols. 1-42“  
World Health Organization, Lyon, France (1987)
  - [43] H. A. J. Schut und E. G. Snyderwine; DNA-adducts of heterocyclic amine food mutagens - implications for mutagenesis and carcinogenesis  
Carcinogenesis, 20(1999) 353-368
  - [44] T. Sugimura, M. Nagao und T. Gawachi in H. H. Hiatt, J. D. Watson und J. A. Winsten (Editors) „Origins of Human Cancer“  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1977) 1561-1577
  - [45] B. Commoner, A. J. Vithayathil, P. Dolara, S. Nair, P. Madyastha und G. C. Guca; Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking  
Science, 201(1978) 913-916
  - [46] T. Enya, H. Suzuki, T. Watanabe, T. Hirayama und Y. Hisamatsu; 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in Diesel exhaust and airborne-particulates  
Environ. Sci. Technol, 31(1997) 2772-2776
  - [47] C. A. Bieler, M. Wießler, L. Erdinger, H. Suzuki, T. Enya und H. H. Schmeiser; DNA adduct formation from the mutagenic air pollutant 3-Nitrobenzanthrone  
Mut. Res., 439(1999) 307-311
  - [48] A. M. J. Fichtinger-Schepman, A. T. Van Oosterom, P. H. M. Lohman, F. Behrends; cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of cis-Diamminedichloroplatinum(II)  
Cancer Res., 47(1987) 3000-3004
  - [49] A. Eastman; Glutathione-mediated activation of anticancer platinum(IV) complexes  
Biochem. Pharm.; 36(1987) 4177-4178
  - [50] J. M. Malinge, M. J. Giraudpanis und M. Leng; Interstrand cross-links of Cisplatin induce striking distortions in DNA



- [51] J. Reedijk; The relevance of hydrogen-bonding in the mechanism of action of platinum antitumor compounds  
*Inorg. Chem. Acta*, 200(1992) 873-881
- [52] J. M. Essigmann, R. G. Croy, A. M. Nadzan, W. F. Busby, V. N. Reinhold, G. Buchi und G. N. Wogan; Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B<sub>1</sub> in vitro  
*PNAS*, 74(1977) 1870-1874
- [53] J. K. Lin, J. A. Miller und E. C. Miller; 2,3-Dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B<sub>1</sub>, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA or -ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome-mediated reactions and in rat liver in vivo  
*Cancer Res.*, 41(1977) 4430-4438
- [54] H. H. Schmeiser, K.-B. Schoepe und M. Wießler; DNA adduct formation of aristolochic acid-I and acid-II in vitro and in vivo  
*Carcinogenesis*, 9(1988) 297-303
- [55] W. Pfau, H. H. Schmeiser und M. Wießler; Aristolochic acid binds covalently to the exocyclic amino group of purine nucleotides in DNA  
*Carcinogenesis*, 11(1990) 313-319
- [56] H. H. Schmeiser, J. W. G. Janssen, J. Lyons, H. Scherf, W. Pfau, A. Buchmann, C. R. Bartram und M. Wießler; Aristolochic acid activates ras genes in rat-tumors at deoxyadenosine residues  
*Cancer Res.*, 50(1990) 5464-5469
- [57] J. L. Nortier, M.-C. Muniz, H. H. Schmeiser, V. M. Arlt, C. A. Bieler, M. Petein, M. F. Depierreux, L. dePauw, D. Abramovicz, P. Vereerstraeten und J.-L. Vanherweghem; Urothelial carcinoma associated with the use of a chinese herbs (*Aristolochia species*)  
*N. Engl. J. Med.*, 342(2000) 1686-1692
- [58] H. Bartsch, A. Barbin, M. J. Marion, J. Nair und Y. Guichard; Formation, detection, and dose in carcinogenesis of ethenobases in DNA  
*Drug Metab. Rev.*, 26(1994) 349-371
- [59] K. B. Beckman und B. N. Ames; The free-radical theory of aging matures  
*Physiol. Rev.*, 78(1998) 547-581
- [60] H. J. Helbock, K. B. Beckman, M. K. Shigenaga, P. B. Walter, A. A. Woodall, H. C. Yeo und B. N. Ames; DNA oxidation matters - The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine  
*PNAS*, 95(1998) 288-293
- [61] L. J. Marnett; Oxyradicals and DNA damage  
*Carcinogenesis*, 21(2000) 361-370
- [62] S. Duffy, A. So und T. H. Murphy; Activation of endogenous antioxidant defenses in neuronal cells prevents free radical-mediated damage  
*J. Neurochem.*, 71(1998) 69-77
- [63] S. B. Farr, R. D'Ari und D. Touati; Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase  
*PNAS*, 83(1986) 8268-8272
- [64] N. Abril und C. Pueyo; Mutagenesis in *Escherichia-Coli* lacking catalase  
*Environ. Mol. Mutagen.*, 15(1990) 184-189
- [65] P. Chary, D. Dillon, A. L. Schroeder und D. O. Natvig; Superoxide-dismutase (Sod-1) null mutants of *Neurospora-crassa* - oxidative stress sensitivity, spontaneous mutation-rate and response to mutagens  
*Genetics*, 137(1994) 723-730

- [66] A. Jenner, T. G. England, O. I. Aruoma und B. Halliwell; Measurement of oxidative DNA-damage by gas-chromatography mass-spectrometry - ethanethiol prevents artifactual generation of oxidized DNA bases  
*Biochem. J.*, 331(1998) 365-369
- [67] J. R. Wagner, C. C. Hu und B. N. Ames; Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA  
*PNAS*, 89(1992) 3380-3384
- [68] H. Esterbauer in D. C. H. McBrien und T. F. Slater (Editors) „Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer“  
*Academic Press, London (1982) 101-128*
- [69] F. L. Chung, H. J. Chen und R. G. Nath; Lipid-peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA-adducts  
*Carcinogenesis*, 17(1996) 2105-2111
- [70] P. C. Burcham; Genotoxic lipid-peroxidation products - their DNA-damaging properties and role in formation of endogenous DNA-adducts  
*Mutagenesis*, 13(1988) 287-305
- [71] K. D. Robertson und P. A. Jones; DNA methylation: past, present and future directions  
*Carcinogenesis*, 21(2000) 461-467
- [72] J. M. Zingg und P. A. Jones; Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis  
*Carcinogenesis*, 18(1997) 869-882
- [73] T. Rein, M. L. DePamphilis und H. Zorbas; Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes  
*Nucl. Acids Res.*, 26(1998) 2255-2264
- [74] L. S. Chuang, H. H. Ng, J. N. Chia und B. F. Li; Characterization of independent DNA and multiple Zn-binding domains at the N-terminus of human DNA-(cytosine-5)methyltransferase - modulating the property of a DNA-binding domain by contiguous Zn-binding motifs  
*J. Mol. Biol.*, 257(1996) 935-948
- [75] H. Leonhardt, A. W. Page, H. U. Weier und T. H. Bestor; A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA-replication in mammalian nuclei  
*Cell*, 71(1992) 865-873
- [76] M. A. Gama Sosa, R. M. Midgett, V. A. Slagel, S. Githens, K. C. Kuo, C. W. Gehrke und M. Ehrlich; Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals  
*Biochim. Biophys. Acta*, 740(1990) 212-219
- [77] S. Kochanek, M. Toth, A. Dehmel, D. Renz und W. Doerfler; Interindividual concordance of methylation profiles in human genes for tumor-necrosis-factor-alpha and factor-beta  
*PNAS*, 87(1990) 8830-8834
- [78] J. M. Zingg, G. Pedraza Alva und J. P. Jost; Myod1 promoter autoregulation is mediated by 2 proximal E-boxes  
*Nucl. Acids Res.*, 22(1994) 2234-2241
- [79] P. W. Laird und R. Jaenisch; DNA methylation and cancer  
*Hum. Mol. Genet.*, 3(1994) 1487-1495
- [80] P. A. Jones, W. M. Rideout, J. C. Shen, C. H. Spruck und Y. C. Tsai; Methylation, mutation and cancer  
*Bioessays*, 14(1992) 33-36
- [81] P. A. Jones; DNA methylation errors and cancer  
*Cancer Res.*, 56(1996) 2463-2467

- [82] T. L. Kautiainen und P. A. Jones; DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture  
*J. Biol. Chem.*, 261(1986) 1594-1598
- [83] J. L. Counts und J. I. Goodman; Hypomethylation of DNA - a nongenotoxic mechanism involved in tumor promotion  
*Toxicol. Lett.*, 82/83(1995) 663-672
- [84] P. M. Pollock, J. V. Pearson und N. K. Hayward; Compilation of somatic mutations of the Cdkn2 gene in human cancers - nonrandom distribution of base substitutions  
*Genes, Chrom. Cancer*, 15(1996) 77-88
- [85] M. C. Poirier, R. M. Santella und A. Weston; Carcinogen macromolecular adducts and their measurement  
*Carcinogenesis*, 21(2000) 353-359
- [86] M. C. Poirier; Antibodies to carcinogen-DNA adducts  
*J. Natl. Cancer Inst.*, 67(1981) 515-519
- [87] P. T. Strickland und J. M. Boyle; Immunoassay of carcinogen-modified DNA  
*Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 31(1984) 1-58
- [88] M. C. Poirier; Antisera specific for carcinogen-DNA adducts and carcinogen-modified DNA - applications for detection of xenobiotics in biological samples  
*Mut. Res.*, 288(1993) 31-38
- [89] C. P. Wild; Antibodies to DNA alkylation adducts as analytical tools in chemical carcinogenesis  
*Mut. Res.*, 233(1990) 219-233
- [90] D. H. Phillips und M. Castegnaro; Standardization and validation of DNA adduct postlabeling methods - report of interlaboratory trials and production of recommended protocols  
*Mutagenesis*, 14(1999) 301-315
- [91] D. H. Phillips; Detection of DNA modifications by the <sup>32</sup>P-postlabelling assay  
*Mut. Res.*, 378(1997) 1-12
- [92] K. Randerath und E. Randerath; P-32 postlabeling methods for DNA adduct detection - overview and critical-evaluation  
*Drug Metab. Rev.*, 26(1994) 67-85
- [93] K. Randerath, M. V. Reddy und R. C. Gupta; <sup>32</sup>P-labelling test for DNA damage  
*PNAS*, 78(1981) 6126-6129
- [94] A. Weston; Physical methods for the detection of carcinogen-DNA adducts in humans  
*Mut. Res.*, 288(1993) 19-29
- [95] A. Weston und M. C. Poirier in H. A. Milman und E. K. Weisburger (Editors) „Handbook of Carcinogen Testing“  
*Noyes Publication, Park Ridge* (1994)
- [96] A. M. Jeffrey in J. D. Groopman und P. L. Skipper (Editors) „Molecular Dosimetry and Human Cancer: Analytical, Epidemiological und Social Considerations“  
*CRC Press, Boca Raton* (1991) 249-261
- [97] Y. Yamamoto und B. N. Ames; Detection of lipid hydroperoxides and hydrogen peroxide at picomole levels by an HPLC and isoluminol chemiluminescence assay  
*Free Radic. Biol. Med.*, 3(1987) 359-361
- [98] C. Norwood und P. Vouros in D. M. Desiderio (Editor) „Mass Spectrometrie: Clinical and Biomedical Applications“  
*Plenum Press, New York* (1994) 89-133
- [99] R. C. Garner; The role of DNA-adducts in chemical carcinogenesis

*Mut. Res.*, 402(1998) 67-75

- [100] R. C. Gupta, M. V. Reddy und K. Randerath;  $^{32}\text{P}$ -postlabelling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts  
*Carcinogenesis*, 3(1982) 1081-1092
- [101] M. V. Reddy, R. C. Gupta, E. Randerath und K. Randerath;  $^{32}\text{P}$ -postlabelling test for covalent DNA binding of chemicals in vivo  
*Carcinogenesis*, 5(1984) 231-243
- [102] R. C. Gupta; Enhanced sensitivity of  $^{32}\text{P}$ -postlabeling analysis of aromatic carcinogen-DNA adducts  
*Cancer Res.*, 35(1985) 5656-5662
- [103] O. J. Schmitz und E. Richter; Capillary zone electrophoresis with on-line blotting for separation and detection of  $^{32}\text{P}$ -postlabeled DNA adducts  
*Biomarkers*, in press
- [104] F. Kohlrausch; Über Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen  
*Ann. Phys. Chem.*, 62(1897) 209-239
- [105] A. Tiselius; A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures  
*Trans. Faraday Soc.*, 33(1937) 524-531
- [106] S. Hjertén; Free zone electrophoresis  
*Chromatogr. Rev.*, 9(1967) 122-239
- [107] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts und T. P. E. M. Verheggen; High performance zone electrophoresis  
*J. Chromatogr.*, 169(1979) 11-20
- [108] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs; Capillary zone electrophoresis  
*Science*, 222(1983) 266-272
- [109] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs; High resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis  
*J. Chromatogr.*, 218(1981) 209-216
- [110] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs; Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries: preliminary data on performance  
*HRC&CC*, 4(1981) 230-231
- [111] P. W. Atkins „Physikalische Chemie“  
*Verlag Chemie, Weinheim* (1988)
- [112] F. Foret, L. Krivánková und P. Bocek „Capillary Zone Elektrophoresis“  
*Verlag Chemie, Weinheim* (1993)
- [113] J. O'M. Bockris und A. K. N. Reddy „Modern Electrochemistry“  
*Plenum Press, New York* (1970) 826-835
- [114] R. J. Hunter „Zeta Potential in Colloid Science, Principles and Applications“  
*Academic Press, London* (1981)
- [115] H. Engelhardt, W. Beck und T. Schmitt „Kapillarelektrophorese“  
*Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden* (1994)
- [116] J. H. Knox; Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation  
*Chromatographia*, 26(1988) 329-337
- [117] J. Preisler, F. Foret und B. L. Karger; Online MALDI-TOF-MS using a continuous vacuum deposition interface

- Anal. Chem.*, 70(1998) 5278-5287
- [118] R. Kuhn und S. Hoffstetter-Kuhn „Capillary Electrophoresis: Principles and Practice“  
*Springer-Verlag, Heidelberg (1993)*
- [119] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya und T. Ando; Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries  
*Anal. Chem.*, 56(1984) 111-113
- [120] S. Terabe, K. Otsuka und T. Ando; Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary  
*Anal. Chem.*, 57(1985) 834-841
- [121] D. N. Heiger in „High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction“  
*Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, Germany (1992) 58-65*
- [122] A. Mayer und S. Neuenhofer; Luminescent labels - more than just an alternative to radioisotopes  
*Angew. Chem.*, 106(1994) 1097-1126
- [123] R. P. Haugland in M. T. Z. Spence (Editor) „Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6<sup>th</sup> Edition“  
*Molecular Probes Inc., Eugene (1996)*
- [124] A. Treibs und F.-H. Kreuzer; Difluoroboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen  
*Liebigs Ann. Chem.*, 718(1968) 208
- [125] D. B. Craig, J. C. Y. Wong und N. J. Dovichi; Detection of attomolar concentrations of alkaline phosphatase by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection  
*Anal. Chem.*, 68(1996) 697-700
- [126] J. Karolin, L. B.-A. Johansson, L. Strandberg und T. Ny; Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes and proteins  
*J. Am. Chem. Soc.*, 116(1994) 7801-7806
- [127] J. P. Liu, O. Shirota und M. Novotny; Capillary electrophoresis of amino-sugars with Laser-induced fluorescence detection  
*Anal. Chem.*, 63(1991) 413-417
- [128] S. C. Beale, Y. Z. Hsieh, D. Wiesler und M. Novotny; Application of 3-(2-Furoyl)quinoline-2-carbaldehyde as a fluorogenic reagent for the analysis of primary amines by liquid-chromatography with Laser-induced fluorescence detection  
*J. Chromatogr.*, 499(1990) 579-587
- [129] P. Theisen, C. McCollum, K. Upadhy, K. Jacobson, H. N. Vu und A. Andrus; Fluorescent dye phosphoramidite labeling of oligonucleotides  
*Tetrahedr. Lett.*, 33(1992) 5033-5036
- [130] F. Schubert, K. Ahlert, D. Cech und A. Rosenthal; One-step labelling of oligonucleotides with fluoresceine during automated synthesis  
*Nucl. Acids Res.*, 18(1990) 3427
- [131] G. T. Hermanson in „Bioconjugate Techniques“  
*Academic Press, San Diego (1996) 169-186*
- [132] H. G. Khorana, .The chemistry of carbodiimides  
*Chem. Rev.*, 53(1953) 145-166
- [133] D. G. Hoare und D. E. Koshland, .A method for the quantitative modification and estimation of carbocyclic acid groups in proteins  
*J. Biol. Chem.*, 242(1967) 2447-2453

- [134] T.-Y. Lin und D. E. Koshland, Carboxyl group modification and the activity of lysozyme  
*J. Biol. Chem.*, 244(1969) 505-508
- [135] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank und G. L. Boshart, A convenient synthesis of water soluble carbodiimides  
*J. Org. Chem.*, 26(1961), 2525-2528
- [136] F. Sanger, S. Nickleln und A. R. Coulson; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors  
*PNAS*, 74(1977) 5463-5467
- [137] E. M. Southern; Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis  
*J. Biol. Chem.*, 98(1975) 503-517
- [138] L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent und L. E. Hood; Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis  
*Nature*, 321(1986) 674-679
- [139] W. Ansorge, B. Sproat, J. Steegemann, C. Schwager und M. Zenke; Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis  
*Nucl. Acids Res.*, 15(1987) 4593-4602
- [140] A. E. Karger, J. M. Harris und R. F. Gesteland; Multiwavelength fluorescence detection for DNA sequencing using capillary electrophoresis  
*Nucl. Acids Res.*, 19(1991) 4955-4962
- [141] S. Agrawal, C. Christodoulou und M. J. Gait; Efficient methods for attaching non-radioactive labels to the 5'ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides  
*Nucl. Acids Res.*, 14(1986) 6227-6245
- [142] N. T. Thuong und M. Chassignol; Solid-phase synthesis of oligo-alpha-deoxynucleotides and oligo-beta-deoxynucleotides covalently linked to an acridine  
*Tetrahedr. Lett.*, 29(1988) 5905-5908
- [143] T. Tanaka, Y. Yamada und M. Ikehara; Polymer support synthesis of oligodeoxyribonucleotide with an aminoethyl or aminohexyl group at the 5' end by the phosphite-triester approach  
*Chem. Pharm. Bull.*, 36(1988) 1386-1392
- [144] S. Agrawal und P. C. Zamecnik; Site specific functionalization of oligonucleotides for attaching 2 different reporter groups  
*Nucl. Acids Res.*, 18(1990) 5419-5423
- [145] S. Tang und S. Agrawal; Incorporation of multiple reporter groups on synthetic oligonucleotides  
*Nucl. Acids Res.*, 18(1990) 6461
- [146] U. Asseline und N. T. Thuong; Synthesis of oligonucleotides covalently linked to intercalating agents and to reactive groups  
*Nucleosides & Nucleotides*, 10(1991) 359-362
- [147] L. M. Smith, S. Fung, M. W. Hunkapillar, T. J. Hunkapillar und L. E. Hood; The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5'terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis  
*Nucl. Acids Res.*, 13(1985) 2399-2412
- [148] K. Yamana, T. Gokota, H. Ozaki, H. Nakano, O. Sangen und T. Shimidzu; Enhanced fluorescence in the binding of oligonucleotides with a pyrene group in the sugar fragment to complementary polynucleotides  
*Nucleosides & Nucleotides*, 11(1992) 383-390
- [149] P. R. Langer, D. C. Waldrop und D. C. Ward; Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes  
*PNAS*, 78(1981) 6633-6637

- [150] S. R. Sarfati, S. Pochet, C. Guerriero, A. Namane, T. Huynh-Dinh und J. Ingolen; Synthesis of fluorescent or biotinylated nucleoside compounds  
*Tetrahedron*, 43(1987) 3491-3497
- [151] A. Roget, H. Bazin und R. Teoule; Synthesis and use of labeled nucleoside phosphoramidite building-blocks bearing a reporter group - biotinyl, dinitrophenyl, pyrenyl and dansyl  
*Nucl. Acids Res.*, 17(1987) 7643-7651
- [152] S. R. Sarfati und A. Namane; Synthesis of fluoresceinylated 2'-deoxyadenosine-monophosphate, diphosphate and triphosphate derivatives  
*Tetrahedr. Lett.*, 31(1990) 2581-2584
- [153] H. Sigmund, T. Maier und W. Pfeleiderer; A new type of fluorescence labeling of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides  
*Nucleosides & Nucleotides*, 16(1997) 685-696
- [154] C. C. T. Wörth, O. J. Schmitz, H.-C. Kliem und M. Wießler; Synthesis of fluorescently labeled alkylated DNA adduct standards and separation by capillary electrophoresis  
*Electrophoresis*, 21(2000) 2086-2091
- [155] B. C. F. Chu, G. M. Wahl und L. E. Orgel; Derivatisation of unprotected polynucleotides  
*Nucl. Acids Res.*, 11(1983) 6513-6529
- [156] D. J. Kelman, K. T. Lilga und M. Sharma; Synthesis and application of fluorescent labeled nucleotides to assay DNA damage  
*Chem-Biol. Interactions*, 66(1988) 85-100
- [157] A. N. Al-Deen, D. C. Cecchini, S. Abdel-Baky, N. M. Abdel Moneam und R. W. Giese; Preparation of ethylenediaminephosphoramidates of nucleotides and derivatization with fluoresceine isothiocyanate  
*J. Chrom.*, 512(1990) 409-414
- [158] P. Wang und R. W. Giese; Phosphate-specific fluorescence labeling under aqueous conditions  
*Anal. Chem.*, 65(1993) 3518-3520
- [159] P. Wang und R. W. Giese; Phosphate-specific fluorescence labeling with BO-IMI: reaction details  
*J. Chrom. A*, 809(1998) 211-218
- [160] C. Vargeese, J. Carter, J. Yegge, S. Krivjansky, A. Settle, E. Kropp, K. Peterson und W. Pieken; Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-Dicyanoimidazol during oligonucleotide synthesis  
*Nucl. Acids Res.*, 26(1998) 1046-1050
- [161] B. H. Dahl, J. Nielsen und O. Dahl; Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. I. Evidence for nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with the phosphorus substituents  
*Nucl. Acids Res.*, 15(1987) 1729-1743
- [162] J.-K. Chen, R. G. Schultz, D. H. Lloyd und S. M. Gryaznov; Synthesis of oligodeoxyribonucleotide N3'-P5' phosphoramidates  
*Nucl. Acids Res.*, 23(1995) 2661-2668
- [163] S. M. Gryaznov, D. H. Lloyd, J. K. Chen, R. G. Schulz, L. A. Dedionisio, L. Ratmeyer und W. D. Wilson; Oligonucleotide N3'-P5'-phosphoramidates  
*PNAS*, 92(1995) 5798-5802
- [164] S. Gryaznov und J. K. Chen; Oligodeoxyribonucleotide N3'-P5'-phosphoramidates - synthesis and hybridization properties  
*J. Am. Chem. Soc.*, 116(1994) 3143-3144
- [165] J. S. Nelson, K. L. Fearon, M. Q. Nguyen, S. N. McCurdy, J. E. Frediani, M. J. Foy und B. Hirschbein; N3'-P5'-oligodeoxyribonucleotide phosphoramidates: a new method of synthesis based on a phosphoramidite amine-exchange reaction  
*J. Org. Chem.*, 62(1997) 7278-7287

- [166] Z. H. Lan, P. Wang und R. W. Giese; Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometrie of deoxynucleotides labeled with an IMI dye  
*Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 13(1999) 1454-1457
- [167] Z. H. Lan, X. Quian und R. W. Giese; Preparation of an IMI dye (imidazol functional group) containing a 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole fluorophore for labeling of phosphomonoesters  
*J. Chromatogr. A*, 831(1999) 325-330
- [168] R. C. Weast (Editor); „Handbook of Chemistry and Physics, 56<sup>th</sup> Edition“  
*CRC Press, Cleveland, 1974*
- [169] R. L. Lundblad und C. M. Noyes; „Chemical Reagents for Protein Modification“  
*CRC Press, Boca Raton, 1984 Vol. 2 Chap. 4*
- [170] M. G. Ivanovskaya, M. B. Gottikh und Z. A. Shabarova; Modifikation of oligo(poly)nucleotide phosphomonoester groups in aqueous solutions  
*Nucleosides & Nucleotides*, 6(1987) 913-934
- [171] J. T. Ibrahim und A. Williams; Reaction of the water-soluble reagent N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide with nucleophiles: participation of the tautomeric cyclic ammonioamidine as a kinetically important intermediate  
*J. Am. Chem. Soc.*, 100(1978) 7420-7421
- [172] M. A. Gilles, A. Q. Hudson und C. L. Borders; Stability of water-soluble carbodiimids in aqueous solution  
*Anal. Biochem.*, 184(1990) 244-248
- [173] S. A. Kuznetsova, I. E. Kanevsky und Z. A. Shabarova; Design and synthesis of double-stranded oligonucleotides containing reactive acylphosphate internucleotide groups  
*FEBS Lett.*, 431(1998) 453-456
- [174] Z. Grabarek und J. Gergely; Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters  
*Anal. Biochem.*, 185(1990) 131-135
- [175] A. J. Murphy; Reaction of a carbodiimide adduct of ATP at the active site of Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase  
*Biochem.*, 29(1990) 11236-11242
- [176] J. V. Staros, R. W. Wright und D. M. Swingle; Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions  
*Anal. Biochem.*, 156(1986) 220-222
- [177] M. E. Kuipers, P. J. Swart, M. M. W. B. Hendriks und D. K. F. Meijer; Optimization of the reaction conditions for the synthesis of neoglycoprotein-AZT-monophosphate conjugates  
*J. Med. Chem.*, 38(1995) 883-889
- [178] M. Kibler und K. Bächmann; New derivatization method for carboxylic acids in aqueous solution for analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection  
*J. Chromatogr. A*, 836(1999) 325-331
- [179] H. G. O. Becker; „Einführung in die Photochemie“  
Thieme Verlag, Stuttgart, 1983, 2. Aufl.
- [180] C. A. M. Seidel, A. Schulz und M. Sauer; Nucleobase-specific quenching of fluorescent dye: 1. Nucleobase one-electron redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies  
*J. Phys. Chem.*, 100(1996) 5541-5553
- [181] U. Lieberwirth, J. Arden-Jakob, K.-H. Drexhage, D. P. Herten, R. Müller, M. Neumann, A. Schulz, S. Siebert, G. Sagner, S. Klingel, M. Sauer und J. Wolfrum; Multiplex dye DNA-sequencing in capillary gel-electrophoresis by diode Laser-based time-resolved fluorescence detection  
*Anal. Chem.*, 70(1998) 4771-4779



- [182] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield und M. R. Wasielewski; Distance-dependent electron-transfer in DNA hairpins  
*Science*, 277(1997) 673-676
- [183] S. Steenken und S. V. Jovanovic; How easily oxidizable is DNA - one-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous-solution  
*J. Am. Chem. Soc.*, 119(1997) 617-618
- [184] L. Frostesjo, I. Holm, B. Grahn, A. W. Page, T. H. Bestor und O. Heby; Interference with DNA methyltransferase activity and genome methylation during F9 teratocarcinoma stem-cell differentiation-induced by polyamine depletion  
*J. Biol. Chem.*, 272(1997) 4359-4366
- [185] A. Collins, J. Cadet, B. Epe und C. Gedik; Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997  
*Carcinogenesis*, 18(1997) 1833-1836
- [186] T. Lee, E. S. Yeung und M. Sharma; Micellar elektrokinetic capillary chromatographic separation and laser-induced fluorescence detection of 2'-deoxynucleoside 5'-monophosphates of normal and modified bases  
*J. Chromatogr.*, 565(1991) 197-206
- [187] R. L. Chien und D. S. Burgi; Sample stacking of an extremely large injection volume in high-performance capillary electrophoresis  
*Anal. Chem.*, 64(1992) 1046-1050
- [188] R. L. Chien und D. S. Burgi; On-column sample concentration using field amplification in CZE  
*Anal. Chem.*, 64(1992) A489-A496
- [189] H. Kaiser und H. Specker; Bewertung und Vergleich von Analysenverfahren  
*Fres. Z. Anal. Chem.*, 149(1956) 46-66
- [190] M. Sharma, R. Jain, E. Ionescu und H. K. Slocum; Capillary electrophoretic separation and laser-induced fluorescence detection of the major DNA adducts of cisplatin and carboplatin  
*Anal. Biochem.*, 228(1995) 307-311
- [191] H. H. Schmeiser, E. Frei, M. Wiessler und M. Stiborová; Comparison of DNA adduct formation by aristolochic acids in various *in vitro* activation systems by <sup>32</sup>P-postlabelling: evidence for reductive activation by peroxidases  
*Carcinogenesis*, 18(1997) 1055-1062
- [192] R. Doll und R. Peto; The causes of cancer – quantitative estimates of avoidance risks of cancer in the United States today  
*J. Natl. Cancer Inst.*, 66(1981) 1197-1312
- [193] B. N. Ames; Dietary carcinogens and anticarcinogens  
*Science*, 221(1987) 1256-1264
- [194] M. Zeisig, T. Hofer, J. Cadet und L. Möller; <sup>32</sup>P-postlabeling high-performance liquid chromatography (<sup>32</sup>P-HPLC) adapted for analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine  
*Carcinogenesis*, 20(1999) 1241-1245
- [195] J. Nakamura, V. E. Walker, P. B. Upton, S.-Y. Chiang, Y. W. Kow und J. A. Swenberg; Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions  
*Cancer Res.*, 58(1998) 222-225
- [196] V. J. Mendelez-Colon, A. Lurch, A. Seidel und W. M. Baird; Cancer initiation by polycyclic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites  
*Carcinogenesis*, 20(1999) 1885-1891
- [197] T. Lindahl und B. Nyberg; Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid  
*Biochemistry*, 11(1972) 3610-3618

- [198] S. Shibutani, A. Fernandes, N. Suzuki, L. Zhou, F. Johnson und A. P. Grollman; Site-specific mutagenesis of the N-(Desoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-B-Phenylimidazo(4,5-B)pyrimidine DNA adduct in mammalian cells  
*Food Res. Techn.*, 207(1998) 459-463
- [199] S. Shibutani, L. A. Margulis, N. E. Geacintov und A. P. Grollman; Taranslesional synthesis on a DNA template containing a single stereoisomer of dG(+)- or dG(-)-*anti*-BDPE(7,8-Dihydroxy-*anti*-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene)  
*Biochemistry*, 32(1993) 7531-7541
- [200] H. Lee, M. Hinz, J. J. Stezowski und R. G. Harvey; Syntheses of polycyclic aromatic hydrocarbon-nucleoside and oligonucleotide adducts specifically alkylated on the amino functions of deoxyguanosine and deoxyadenosine  
*Tetrahedr. Lett.*, 31(1990) 6773-6776
- [201] C. M. Harris, L. Zhou, E. A. Strand und T. H. Harris; New strategy for the synthesis of oligideoxynucleotides bearing adducts at exocyclic amino sites of purine nucleosides  
*J. Am. Chem. Soc.*, 113(1991) 4328-4329
- [202] W. Pfau, B. L. Pool-Zobel, C.-W. von der Lieth und M. Wießler; The structural basis for the mutagenicity of aristolochic acid  
*Cancer Lett.*, 55(1990) 7-11
- [203] W. Pfau, H. H. Schmeiser und M. Wießler; N<sup>6</sup>-Adenyl arylation of DNA by aristolochic acid II and a synthetic model for the putative proximate carcinogen  
*Chem. Res. Toxicol.*, 4(1991) 581-586